

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Analytická chemie



Mgr. Jana Vosáhlová

Studium redoxních reakcí a adsorpce 4-nitrofenyltriazolem
značených nukleosidů a kresolů na borem dopovaných
diamantových elektrodách pro vývoj elektroanalytických metod

Study of redox reactions and adsorption of 4-nitrophenyl triazole labeled
nucleosides and cresols on boron doped diamond electrodes for
development of electroanalytical methods

Disertační práce

Vedoucí práce: doc. RNDr. Karolina Schwarzová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Jiří Barek, CSc.

Ing. Václav Petrák, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne:

Podpis

Abstrakt

V této práci byly testovány borem dopované diamantové elektrody s různou úpravou povrchu pro vybrané oxidovatelné a redukovatelné modelové látky, konkrétně *p*- a *o*- izomery kresolu a 2'-deoxycytidin a 7-deazaadenosin značené 4-nitrofenyltriazolem (dC^{TRNO_2} a dA^{TRNO_2}). Cílem bylo studium elektrochemických a adsorpčních dějů s následným vývojem voltametrických metod detekce studovaných látek, popřípadě použití borem dopované elektrody jako pracovní elektrody v průtokových systémech.

Kresoly byly použity jako modelové oxidovatelné analyty. Na O-terminované a leštěné BDD elektrodě poskytují oxidační signál díky oxidaci na methylfenoxyradikál. Bylo dosaženo porovnatelných hodnot oxidačního potenciálu jako na ostatních studovaných uhlíkových elektrodách, tj. elektrodě ze skelného uhlíku, elektrodě z pyrolytického grafitu a uhlíkové pastové elektrodě. Tyto elektrodové materiály vykazují relativně vysokou náchylnost k adsorpci reakčních produktů, přičemž na borem dopovaném diamantu je jejich adsorpce minimální. *In situ* anodická aktivace umožňuje rychlou regeneraci povrchu borem dopovaného diamantu před každým skenem. Vyvinutá diferenční pulsní voltametrická metoda s detekčním limitem v rozsahu $0,61 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $2,97 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, která byla testována na modelových vzorcích říční vody, tak představuje rychlou a levnou metodu pro detekci jednotlivých kresolů. V případě směsi kresolů a dalších fenolických polutantů je potřeba provést jejich separaci. Navržená metoda HPLC s elektrochemickou detekcí ukazuje, že borem dopované diamantové elektrody jsou vhodné pro detekci analytů výrazně pasivujících povrch elektrody při průtokových i vsádkových voltametrických měřeních.

Borem dopované diamantové elektrody jsou stále více vyhledávaným typem elektrodového materiálu i pro redukční děje, jak bylo ukázáno na příkladě 2'-deoxycytidinu a 7-deazaadenosinu značených 4-nitrofenyltriazolem. Tyto komplexní molekuly i produkty jejich následných voltametrických reakcí (tj. příslušné nitroso a hydroxylamino deriváty) se silně adsorbují na leštěný povrch elektrody. Lze ji tedy využít k transferovým technikám, jak bylo ukázáno na příkladě squarewave voltametrické detekce dA^{TRNO_2} . Adsorbovaný produkt redukce, hydroxylamin, podléhá následné oxidaci na nitroso skupinu a signál quasireversibilního páru NO/NHOH lze poté použít pro jejich kvantifikaci. Na povrch elektrody se silně adsorbuje i dA^{TR} , tj. derivát 7-deazaadenosinu neobsahující nitro skupinu. V přítomnosti dA^{TR} na povrchu

borem dopované elektrody při měření dalších analytů byl sledován pokles redukčního signálu dalších jednoduchých organických látek obsahujících nitroskupinu (2-nitronaftalen a 4-nitrofenylacetylen), jejichž reakce na borem dopovaném diamantu je řízena difuzí.

Abstract

In this work, the application of boron-doped diamond electrodes with various surface pre-treatment were tested on selected oxidizable and reducible model compounds, specifically *para* and *ortho* cresols and 2'-deoxycytidine and 7-deazaadenosine labeled by 4-nitrophenyl triazole. The aim of the study was the investigation of electrochemical and adsorptive processes with respect to the development of electroanalytical methods of detection of the selected compounds, or utilization of boron-doped diamond electrodes as detectors in liquid-flow systems.

Cresols were used as the model oxidizable compound. On O-terminated and polished boron-doped diamond electrodes, cresols provide oxidation signal owing to their oxidation to methylphenoxy radical at comparable potentials as on other carbon-based electrodes used as a reference in this work, *i.e.*, glassy carbon electrode, pyrolytic graphite electrode, and carbon paste electrode. These carbon electrode materials show relatively high propensity to adsorption of reaction products, while such adsorption is minimal on boron-doped diamond. *In situ* anodic activation allows for a rapid regeneration of boron-doped diamond surface prior to each scan. A differential pulse voltammetric method that was developed with a detection limit of $0.61 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ to $2.97 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ and was also tested on model samples of river water, thus presents a fast and cheap alternative for the detection of cresols, as long as they are not present in a mixture. For an analysis of a mixture of cresols and other phenolic pollutants, the need for a separation step arises. In a proposed HPLC with electrochemical detection method it was confirmed that boron-doped diamond is a suitable material for liquid-flow analyses, even for analytes known to severely passivate electrodes during batch voltammetric measurements (such as phenolic compound).

An ever-increasing interest is apparent in utilization of boron-doped diamond electrodes for reduction processes, as presented in this work with 2'-deoxycytidine and 7-deazaadenosine labeled by 4-nitrophenyl triazole. These complex molecules and products of their voltammetric reactions (*i.e.*, corresponding nitroso and hydroxylamino derivatives) strongly adsorb on polished boron-doped diamond electrode surface. Therefore, these electrodes can be used for transfer techniques as shown in this work on an example of squarewave voltammetric detection of $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$. The adsorbed product of the reduction, an hydroxylamine, is subsequently oxidized giving rise to a nitroso group,

and the signal of a quasi-reversible pair NO/NHOH can be used for its quantification. Moreover, dA^{TR}, *i.e.*, a derivative of 2'-deoxycytosine, is also strongly adsorbed on boron-doped diamond surface. A decline in the intensity of the voltammetric signal of simple nitro group-containing organic molecules (2-nitronaphthalene a 4-nitrophenyl acetylene), that is diffusion controlled, was observed in the presence of dATR.

Klíčová slova

adsorpce, borem dopovaný diamant, kresol, elektrochemická detekce, HPLC, nukleosid, nitrofenyltriazol, fenolické sloučeniny, elektroda z pyrolytického grafitu, redoxní značení, terminace povrchu, voltametrie

Key words

adsorption, boron doped diamond, cresol, electrochemical detection, HPLC, nucleosides, nitrophenyl triazole, phenolic compounds, pyrolytic graphite electrode, redox labeling, surface termination, voltammetry

Seznam použitých zkratek a symbolů

- AV ČR – akademie věd České republiky (Czech Academy of Science)
- AFM – mikroskopie atomárních sil (atomic force microscopy)
- ACN – acetonitril (acetonitrile)
- BDD – borem dopovaný diamant (boron doped diamond)
- B/C – poměr boru a uhlíku ve směsi pro depozici BDD filmu
- BR pufr – Brittonův – Robinsonův pufr
- CV – cyklická voltametrie (cyclic voltammetry)
- CPE – uhlíková pastová elektroda (carbon paste electrode)
- CVD – chemická depozice par (chemical vapour deposition)
- DAD – detektor diodového pole (diod array detector)
- dA^{TRNO2} – 7-deazaadenosin značený 4-nitrofenyltriazolem
- dA^{TR} – 7-deazaadenosin značený fenyltriazolem
- dC^{BF} – 2'-deoxycytidin značený benzofurazanem
- dC^{TRNO2} – 2'-deoxycytidin značený 4-nitrofenyltriazolem
- DC voltametrie – voltametrie s lineárním nárůstem potenciálu (direct current voltammetry)
- DNA – deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
- DP voltametrie – diferenční pulzní voltametrie (differential pulse voltammetry)
- EELS – spektroskopie ztráty elektronové energie (Electron energy loss spectroscopy)
- ECHA – evropská agentura pro chemické látky (European chemicals agency)
- E_p – redoxní potenciál (redox potential)
- FID – plamenově ionizační detektor (Flame ionization detector)
- FZU AV ČR – Fyzikální ústav akademie věd České republiky
- GCE – elektroda ze skelného uhlíku (glassy carbon electrode)
- HMDE – visící kapková rtuťová elektroda (hanging mercury drop electrode)
- HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
- HPLC-ED – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí (high-performance liquid chromatography with electrochemical detection)
- HPLC-UV - vysokoúčinná kapalinová chromatografie s ultrafialovou detekcí (high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection)
- I_p – proud (current)

LOD – limit detekce (limit of detection)

NHOH/NO – redoxní pár hydroxylamin/nitroso (redox pair hydroxylamine/nitroso)

PEX – metodika syntézy DNA pomocí prodlužování primerů

PGE – elektroda z pyrolytického grafitu (pyrolytic graphite electrode)

pK_a – disociační konstanta (acid dissociation constant)

R – korelační koeficient (correlation coefficient)

REACH – registrace, evaluace, autorizace a omezování chemických látek

RSD – relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)

S – elektroaktivní plocha elektrody (electroactive area of electrode)

SEM – skenovací elektronová mikroskopie (scanning electron microscopy)

SIMS – spektrometrie sekundárních iontů (secondary ion mass spectrometry)

SW voltametrie – square wave voltametrie (square wave voltammetry)

XPS – rentgenová fotoelektronová spektrometrie (x-ray photoelectron spectrometry)

Obsah

1	ÚVOD.....	14
1.1	Borem dopované diamantové elektrody	14
1.1.1	Příprava diamantových elektrod	16
1.1.2	Vlastnosti diamantových elektrod pro elektroanalýzu.....	17
1.1.3	Vliv předpřípravy (terminace) a čištění elektrodového povrchu	18
1.1.4	Vliv koncentrace dopantu v diamantové elektrodě.....	19
1.2	Využití borem dopovaných diamantových elektrod v elektroanalýze organických sloučenin	20
1.2.1	Fenolické látky.....	21
1.2.1.1	Kresoly.....	22
1.2.2	Elektroanalýza DNA a jejích komponent	23
2	Experimentální část.....	26
2.1	Použité BDD elektrody a aparatura pro voltametrická a amperometrická měření	26
2.2	Pracovní postupy.....	28
2.2.1	Elektrochemická studie kresolů	28
2.2.2	Voltametrická a adsorpční studie DNA nukleosidů značených redukovatelnými redoxními značkami.....	28
3	Výsledky a diskuze	29
3.1	Elektrochemická studie izomerů kresolu	29
3.1.1	Porovnání elektrochemického chování izomerů kresolu na různých typech uhlíkových elektrod	30
3.1.2	Optimalizace voltametrické metody pro stanovení <i>o</i> - a <i>p</i> - kresolu.....	33
3.1.3	Vliv koncentrace boru v BDD filmu na oxidaci kresolů.....	34
3.1.4	HPLC s amperometrickou detekcí na O-terminované BDD elektrodě.....	38
3.1.5	Závěr	42
3.2	Voltametrická a adsorpční studie DNA nukleosidů značených redukovatelnými redoxními značkami.....	43
3.2.1	Elektrochemická studie 2'-deoxycytidinu značeného benzofurazanem	43
3.2.2	Elektrochemická studie 2'-deoxycytidin a 7-deazaadenosinu značeného 4-nitrofenyltriazolem	44
3.2.2.1	Cyklická voltametrie dC^{TRNO_2} a dA^{TRNO_2}	44
3.2.2.2	Transferové adsorpční metody dC^{TRNO_2} a dA^{TRNO_2}	46
3.2.3	Kalibrační závislost.....	51

3.2.4	Závěr.....	52
3.3	Shrnutí	53
4	Literatura	55
5	Poděkování	61
6	Publikační výstupy	62
7	Přílohy	66
7.1	Publikace 1	66
7.2	Publikace 2	78

Cíle práce

Tato práce byla vypracována pod záštitou UNESCO laboratoře elektrochemie životního prostředí, která se zabývá vývojem nových elektrodových materiálů, elektrochemických sensorů a elektroanalytických metod pro stanovení biologicky aktivních organických látek.

Práce je založena výhradně na výsledcích řešení disertačního projektu publikovaných ve 2 publikacích recenzovaných časopisech.

- 1) **Vosáhlová J.**, Sochr J., Baluchová S., Švorc L., Taylor A., Schwarzova K.: Comparison of carbon-based electrodes for detection of cresols in voltammetry and HPLC with electrochemical detection, *Electroanalysis*, 32, (2020), online vydání DOI: 10.1002/elan202060103, IF 2,544 (2019) [1]
- 2) **Vosahlova, J.**, Kolacna L., Danhel A., Fisher J., Balintova J., Hocek M., Schwarzova-Peckova K., Fojta M.: Voltammetric and adsorption study of 4-nitrophenyl-triazole-labeled 2'-deoxycytidine and 7-deazaadenosine nucleosides at boron-doped diamond electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 821 (2018) 111-120, DOI: 10.1016/j.jelechem.2018.01.003, IF 3,519 (2018) [2]

Uvedené publikace jsou přiloženy jako přílohy k disertační práci (kapitola 7).

Práce navazuje na bakalářský [3] a diplomový projekt [4] autorky. Bakalářský projekt [3] byl věnován elektrochemické charakterizaci borem dopovaných diamantových (BDD) elektrod s různým obsahem boru, které byly připraveny ve spolupráci s Fyzikálním ústavem AV ČR. Ty byly následně využity pro detekci 2-aminonaftalenu jako modelového analytu, kdy byl sledován vliv míry dopace na výšku a reprodukovatelnost oxidačního signálu a sledovány parametry vyvinutých voltametrických metod pro detekci této látky. Výsledky této studie jsou součástí rozsáhlejších publikací [5, 6], které se věnují i morfologické a spektrální charakterizaci těchto elektrod. Diplomový projekt [4] byl věnován možností využití BDD elektrod pro detekci redukovatelných látek, např. syntetických azobarviv a vanilinu. Součástí práce je i komplexní studie elektrochemického chování 5-nitrochinolinu, při které byly využity BDD elektrody popsané výše. Výsledky této studie byly taktéž publikovány [7].

Tato disertační práce se se zaměřuje na studium možností použití BDD elektrod v elektroanalýze oxidovatelných a redukovatelných látek. Jako zástupci oxidovatelných

látek byly vybrány kresoly. Kresoly byly vybrány jako modelové analyty pro rozsáhlou skupinu fenolů, které jsou v elektrochemii známy jako problematické analyty pasivující elektrodový povrch. Výsledky jsou shrnuty v publikaci [1] (kapitola 7, Příloha 1). Redukovatelné látky jsou zastoupeny deriváty nukleosidů, konkrétně 7-deazaadenosinem a 2'-deoxycytidinem značených 4-nitrofenyltriazolem [2] (kapitola 7, Příloha 2).

Citace všech publikací autorky jsou v textu zvýrazněny tučně.

Cíle práce jsou následující:

1) Studium elektrochemického chování kresolů na BDD elektrodách s různou úpravou povrchu a jejich porovnání s dalšími uhlíkovými elektrodami. Vývoj voltametrických metod pro stanovení kresolů. Využití BDD elektrod jako amperometrického detektoru v separačních metodách (HPLC) při analýze směsi fenolických polutantů včetně kresolů. Aplikace vyvinutých metod na modelové vzorky říční vody.

2) Studium elektrochemického a adsorpčního chování 2'-deoxycytidinu a 7-deazaadenosinu značených 4-nitrofenyltriazolem vázaným přes p-fenylenový linker na BDD elektrodě a porovnání jejich chování na elektrodě z pyrolytického grafitu (PGE). Studie vlivu různých faktorů (čas, přítomnost jiného analytu) na adsorpci látky na povrch BDD elektrody.

1 ÚVOD

1.1 Borem dopované diamantové elektrody

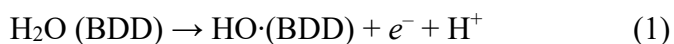
Borem dopované diamantové (BDD) elektrody patří do skupiny pevných uhlíkových elektrod s charakteristickou hybridizací uhlíkového atomu sp^3 . Hybridizace sp^3 jim propůjčuje odlišné elektrochemické, mechanické a fyzikální vlastnosti ve srovnání s klasickými uhlíkovými elektrodami. Diamant není možné použít samotný jako elektrodový materiál, jelikož patří mezi izolanty. Z tohoto důvodu se musí obohacovat jiným vodivým prvkem, nejčastěji borem. Po dopaci diamantového filmu vodivým prvkem si elektroda zachovává částečně unikátní vlastnosti diamantu. Dle koncentrace a elektrochemických vlastností dopantu elektroda získává polovodivé či vodové vlastnosti srovnatelné s kovy. Pole využití tohoto elektrodového materiálu je široké, od použití v elektrosyntéze [8], degradaci organických polutantů [9] až k použití v elektroanalýze včetně konstrukce biosenzorů [10, 11].

BDD elektrodám a jejich použití v elektroanalýze bylo od jejich zavedení v roce 1992 věnováno několik přehledů [8, 10-14]. BDD elektrody jsou především používány jako anody pro elektro-oxidační stanovení organických látek. V posledních letech se objevují i práce věnované detekci redukovatelných analytů [7, 12]. Elektrody z BDD se také uplatňují v elektroanalýze anorganických látek.

Existuje mnoho variant BDD elektrod, které se odlišují materiálem substrátu (na který je elektroda deponována), morfologií diamantového filmu, koncentrací a typem dopantu a terminací povrchu diamantu. Všechny tyto proměnné ovlivňují elektrické a elektrochemické vlastnosti diamantové elektrody a jsou dány parametry při výrobě samotné elektrody, popřípadě mechanickými a elektrochemickými úpravami BDD povrchu finálního produktu.

BDD elektrody se připravují pomocí chemické depozice par s různou iniciací procesu. Jedná se o páry, které obsahují zdroj uhlíku (např. metan), zdroj boru a vodík. Iniciační reakcí dochází k rozkladu molekuly vodíku H_2 . Složením deponované směsi plynů a nastavením doby depozice, lze ovlivnit strukturu BDD filmu a jeho složení (detailně popsáno v kapitole 1.1.1). Jedním z hlavních parametrů, který ovlivňuje elektrochemické chování elektrody je koncentrace dopantu, který zaručuje a určuje typ vodivosti diamantové elektrody [5] (viz kapitola 1.1.4). Dalším parametrem, kterým jsou ovlivněny elektrochemické vlastnosti diamantové elektrody, je předpříprava

povrchu elektrody (viz kapitola 1.1.3). Tou je možné modifikovat vlastnosti povrchu přímo před požadovanou analýzou, tj. ovlivnit parametry detekce konkrétního analytu. Diamantové elektrody jsou obecně odolné vůči pasivaci elektrodového povrchu. Tato vlastnost je výhodná v případě, kdy k pasivaci dojde vlivem redoxních přeměn analytů na elektrodovém povrchu či následných redoxních nebo chemických přeměn produktů prvotních redoxních reakcí, typicky např. u aromatických aminů či fenolů. K pasivaci dochází i při *in-vitro* a *in-vivo* analýzách, kdy je povrch elektrody ve styku s makromolekulami (např. proteiny) a jinými elektrochemicky aktivními látkami, které mohou elektrodu snadno pasivovat. Jestliže k pasivaci povrchu dochází, je jednou z výhod BDD elektrod poměrně snadná obnova povrchu. Nejčastěji se využívá *in-situ* anodická aktivace, kdy je na elektrodu vkládán potenciál, při kterém dochází k anodickému rozkladu vody dle rovnice 1.



Vznikající hydroxylové radikály jsou silná oxidační činidla a zpravidla s velkou účinností odstraňují pasivační filmy na elektrodách. BDD elektrody vykazují zpravidla také minimální pasivaci při použití v průtokových metodách, kdy omývání mobilní fází zpravidla stačí k omytí produktů, které pasivují elektrodový povrch ve vsádkovém uspořádání. Přestože jsou BDD povrchy méně náchylné k pasivaci pro některé organické (makro)molekuly byla zjištěna samovolná adsorpce na povrch elektrody [2] [15]. Jsou pozorovány dva typy adsorpce na povrch elektrody, a to samovolná adsorpce analytu nebo adsorpce asociátu surfaktantu s analytem. Oba adsorpční principy lze využít pro detekci analytů technikou adsorpční voltametrie či pro analýzu pomocí transferových voltametrických metod [2].

K morfologické, elektronické a elektrochemické charakterizaci BDD filmů je užíváno široké spektrum metod. Pomocí Ramanovy spektrometrie lze zjistit přibližné složení a případně i rozložení atomů v diamantovém filmu. Především lze odhalit případné sp^2 nečistoty a do určité míry stanovit koncentraci dopantu, tj. zjistit o jaký typ elektrody se jedná vzhledem k její vodivosti (rozlišení mezi elektrodami polovodivými a elektrodami s kovovou vodivostí [16, 17]). Dalšími využívanými metodami jsou skenovací elektronová mikroskopie (SEM) [18, 5] a mikroskopie atomárních sil (AFM) [5]. Tyto metody jsou využitelné pro morfologickou charakterizaci diamantového filmu a odhalení případných defektů [16]. Podle velikosti diamantových krystalů jsou rozlišovány filmy mikrokystalické (0,5 μm – 3 μm), nanokystalické (10 nm – 500 nm)

a ultrananokrystalické (<10 nm). Povrch BDD elektrody, složení a typ funkčních skupin, lze studovat pomocí rentgenové fotoelektronové spektroskopie (XPS). Koncentraci boru lze určit pomocí nukleární reakční analýzy nebo spektrometrie sekundárních iontů (SIMS) [19]. XPS a Ramanova spektrometrie může být pomocnou metodou při určení koncentrace boru, typu vodivosti a vlivu terminace elektrody [20]. Další metodou, ze které lze získat informace o morfologii a složení deponovaného diamantového filmu je spektroskopie ztráty elektronové energie (EELS) [17]. K elektrochemické charakterizaci BDD elektrod se používají voltametrické metody s využitím běžných redoxních markerů jako $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ či $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+/2+}$. Rozdíl potenciálu píků $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ je silně závislý na obsahu a typu kyslíkatých skupin na povrchu BDD a je běžně využíván k ověření jejich přítomnosti a pro testování stability odezvy BDD elektrod při dlouhodobém používání.

1.1.1 Příprava diamantových elektrod

Diamantové elektrody se připravují chemickou depozicí par (CVD), nejčastěji za pomoci žhaveného vlákna nebo mikrovlnné plazmy aktivujících směs plynů. Aktivace směsi plynů vede k tvorbě vodíkových radikálů, které dále reagují s methanem. Tato metoda byla vyvinuta během 50. let minulého století, technika procesu depozice diamantového filmu je popsána například v přehledu [21]. Přestože je vliv podmínek přípravy elektrod na růst krystalů studován mnoho let, dosud není tato problematika plně popsána. Růst diamantového filmu, jeho konečné složení a vlastnosti jsou při výrobě pomocí CVD dány několika parametry, a to složením plyné směsi, jejím tlakem, teplotou zvoleného substrátu a celkovým časem depozice. Plyná fáze většinou bývá směs methanu, vodíku a diboranu. Mohou být použity i jiné směsi, např. aceton s methanem a oxidem boritým. Poměr zdroje boru a uhlíku (B/C) v plyné fázi se běžně používá jako informace o koncentraci boru v BDD filmu, bez udání skutečné koncentrace v deponovaném filmu. Koncentrace boru v diamantovém filmu je běžně v rozsahu $10^{17} - 10^{21}$ atomů boru na cm^{-3} diamantového filmu, tento rozsah přibližně odpovídá poměrům B/C 500 až 15000 ppm. Problematické ovlivňování vlastností BDD filmu obsahem boru je dále věnována kapitola 1.1.4.

BDD film je při CVD procesu deponován na substrát, který je očkován krystalky diamantu. Podkladovým materiálem (substrátem) bývá nejčastěji p-křemík, který má podobnou strukturu jako diamant. Nicméně lze použít i jiné vodivé materiály,

například platinu, wolfram a titan. Vyšší teplota substrátu umožňuje připravit méně poškozené filmy s vyšší účinností dopace [22]. Teplotní omezení při depozici diamantového filmu je dáno především možnostmi vybraného substrátu a metodou samotné depozice. Vlastnosti vybraného substrátu určují nejen teplotu v průběhu depozice, ale i variabilitu ve velikosti a tvaru elektrody. Vlastnosti substrátu se také projeví ve výsledných elektrochemických vlastnostech elektrody a možnostech jejího použití. Pomocí CVD lze připravit jak velkoplošné elektrody, tak mikroeletrody, které jsou nejčastěji připravovány depozicí na kovové drátky. Kombinace CVD s litografickými technikami umožňuje i přípravu pole BDD mikroeletrod [23].

1.1.2 Vlastnosti diamantových elektrod pro elektroanalýzu

Borem dopované diamantové elektrody mají výjimečné vlastnosti odlišné od jiných typů elektrod. Různorodost diamantových elektrod a faktory které ji ovlivňují jsou již několik let studovány (kapitola 1.1.1). Pro elektrochemické aplikace je zásadní vodivost BDD filmu. Vodivost je ovlivněna velikostí krystalů diamantového filmu a jejich krystalografickou orientací, nestejnorodým povrchem, obsahem sp^2 nečistot a koncentrací boru jakožto dopantu. Povrchová vodivost diamantové elektrody je ovlivněna terminací povrchu, jak bude zmíněno v následující kapitole 1.1.3.

Jednou z výhod BDD elektrod je poměrně široké potenciálové okno okolo 3 V ve vodných roztocích (až 4 V v roztocích kyselých) [5], které je použitelné jak pro oxidační, tak pro redukční stanovení elektrochemicky aktivních látek. Velikost potenciálového okna je ovlivněna na jedné straně vlastnostmi měřeného roztoku jako je pH a koncentrace použitého základního elektrolytu, na druhé straně vlastnostmi BDD elektrody jako je koncentrace dopantu, kvalita BDD filmu a terminace elektrodového povrchu. Mezi další významné vlastnosti diamantových elektrod patří nízké a stabilní pozadí, malá náchylnost k pasivaci elektrodového povrchu a stabilita materiálu i v silně bazických a kyselých mediích, stejně jako stabilita při velkém proudovém zatížení, využívaném v některých případech k požadované terminaci povrchu. Výhodou je stabilita BDD filmů v ultrazvukových lázních, čehož se využívá při jejich čištění. Pro elektroanalýzu v oblasti negativních potenciálu je důležitá menší citlivost BDD elektrod k redukci rozpuštěného kyslíku v roztoku [7].

Jak bylo řečeno, vlastnosti BDD elektrod jsou dány mnohými faktory, které se navzájem ovlivňují. Je důležité využít potenciál BDD elektrod vhodnou volbou

elektrolytu a terminace povrchu v elektroanalýze, která je často prováděna na komerčně dostupných BDD elektrodách (s přesně danými parametry a omezenou možností jejich změny).

1.1.3 Vliv předpřípravy (terminace) a čištění elektrodového povrchu

Typ obnovy a předpřípravy elektrodového povrchu je jedním z parametrů, který velmi ovlivňuje elektrochemické vlastnosti elektrody [24 - 26]. Předpříprava elektrodového povrchu a jeho aktivace je potřebná ke stabilizaci elektrochemického chování elektrody a jako opatření proti pasivaci elektrodového povrchu. Běžně vyráběné elektrody jsou při prvním použití takzvaně H-terminované, díky přítomnosti vodíku ve směsi plynů pro CVD. Povrch BDD elektrod lze měnit třemi způsoby. Elektrochemie umožňuje vkládání záporného potenciálu z oblasti vývoje vodíku pro získání H-terminovaného povrchu, nebo vkládání kladného potenciálu v oblasti anodického rozkladu vody a vývoje OH radikálů (rovnice 1) pro získání O-terminovaného povrchu. Třetím způsobem je mechanické leštění elektrody, které je prováděno tak jako u jiných typů elektrod pomocí leštění povrchu elektrody Al_2O_3 na leštící podložce a vede k odstranění sp^2 uhlíků na povrchu. Chemické skupiny přítomné na elektrodovém povrchu lze určit pomocí XPS nebo studií reverzibility redoxních markerů [25, 26]. Elektrochemická obnova elektrody *in-situ* je žádaná při použití elektrochemické detekce v separačních metodách.

H-terminované elektrody vykazují rychlejší přenos elektronů, což se projevuje posunem potenciálů redoxních dějů blíže k nule [7]. H-terminovaný povrch má hydrofobní charakter, čímž je zpomalen vývoj vodíku a kyslíku na krajích potenciálového okna a zvětšují se tak pracovní možnosti elektrody. S dobou použití zpravidla rychlost přenosu klesá, jelikož H-terminace povrchu není snadno udržitelná, povrch je zvolna oxidován díky přítomnosti kyslíku v měřených roztocích nebo v okolní atmosféře. Na povrch elektrody působí i pH pracovního roztoku. Proto je nejvhodnější H-terminovaný povrch připravit těsně před použitím elektrody potenciostaticky (vložením záporného potenciálu, zpravidla < -2 V) nebo amperostaticky (vložením záporného proudu o dostatečné hustotě). Na stabilitu H-terminovaného povrchu má vliv také obsah boru v diamantové elektrodě.

Pro dosažení stabilního O-terminovaného povrchu je možné kromě vložení kladného potenciálu využít působení silné kyseliny optimálně ve spojení s varem, nebo

vystavit povrch elektrody kyslíkové plazmě na konci CVD procesu. O-terminovaný povrch borem dopované diamantové elektrody je hydrofilní a zpravidla vykazuje nižší povrchovou vodivost než výše popsaný typ H-terminace. Při použití anodické předpřípravy jsou na povrchu elektrody přítomny skupiny obsahující kyslík např. hydroxylové a etherové skupiny vázané na sp^3 uhlík a keto skupiny a karboxylové skupiny vázané na sp^2 uhlík. O-terminované povrchy se běžně používají pro analýzu organických látek, jelikož je tento typ terminace více stabilní a lze ji snadněji připravit než H-terminované elektrody.

Leštění povrchu BDD elektrody bylo prvně použito až roku 2002, kdy byl povrch leštěný aluminou charakterizován redoxními markery a byl použit pro studium proteinů s kovovými redoxními centry [27]. Leštěné BDD elektrody vykazují rychlejší kinetiku přenosu elektronu než O-terminované povrchy, zpravidla porovnatelnou s povrchy H-terminovanými, ale při jeho použití se ztrácí možnost aktivace *in-situ*. Přesto existuje řada elektroanalytických studií na leštěných BDD elektrodách, jelikož leštění je spolehlivý způsob obnovy elektrodového povrchu. Rychlejší kinetika vede k lepším parametrům analytických metod jako je citlivost a limit detekce, obzvláště při využití pulsních voltametrických metod.

Možnosti předpřípravy elektrody jsou velmi variabilní, a proto je důležité, aby byly při volbě pro konkrétní elektroanalytickou aplikaci uváženy výhody a nevýhody spojené s popsanými postupy, tj. snadnost provedení aktivace, potenciál redoxního děje s ohledem na další přítomné interferenty, reprodukovatelnost signálu a kvalitativní parametry analytické metody.

1.1.4 Vliv koncentrace dopantu v diamantové elektrodě

Elektrochemické vlastnosti diamantových elektrod jsou závislé na koncentraci dopantu, který zaručuje vodivost diamantové elektrody. Množství a vlastnosti samotného dopantu v elektrodovém materiálu mají vliv jak na vodivost, morfologii tak i na elektrochemické vlastnosti diamantové elektrody. Nejčastěji se jako dopant používá bor, ale mohou být použity i jiné vodivé prvky jako například fosfor [28], síra [29], fluor nebo dusík [11]. Jak bylo popsáno výše obsah dopantu (v počáteční směsi při depozici) velmi ovlivňuje výsledný charakter diamantové elektrody. Mění se nejen vodivost diamantu, ale i jeho morfologie a mikrostruktura. Zjištění obsahu dopantu přímo v diamantovém filmu je velmi obtížné a nejčastěji se určuje několika metodami.

V Ramanově spektrometrii je vyhodnocován posun maxima Lorentzianovy složky pásu sp^3 fononu v oblasti cca 1332 cm^{-1} , který je ovlivněn koncentrací boru v BDD filmu [5, 30]. Pozorované maximum se snižuje s rostoucí koncentrací dopantu k nižším vlnovým dálkám [5, 16, 30]. Dále je určení přesné koncentrace boru v diamantovém filmu dosažitelné pomocí SIMS, nebo pomocí nukleární reakční analýzy.

Teoretická hranice změny vodivosti BDD filmu z polovodiče na vodič byla určena pro koncentrace vyšší než 2×10^{20} atomu boru v cm^{-3} diamantového filmu [19], což odpovídá B/C poměru 1000 až 2000 ppm dle podmínek depozice [5]. S rostoucí koncentrací boru se zpravidla zvyšuje obsah sp^2 uhlíku, což vede k zúžení potenciálového okna ve vodných základních elektrolytech [5]. Tento jev byl studován pomocí Ramanovy spektroskopie na různě kvalitních diamantových filmech [16]. Změna elektrochemického chování s obsahem dopantu je znatelná nejen pro redoxní markery, ale i pro organické sloučeniny, jak jsou například aromatické aminy [5, 6], nitrolátky [7], fenoly [1], což je ukázáno v pracích autorky. V těchto studiích bylo prokázáno, že elektrody s vyšší vodivostí vykazují vyšší kinetiku přenosu elektronu než elektrody polovodivého charakteru. Filmy s kovovým typem vodivosti jsou pro elektroanalýzu vhodnější díky vyšší proudové odezvě elektroaktivních látek oproti filmům polovodivým. Pomalejší kinetika se týká i redoxních dějů na okraji potenciálového okna, tzn. využitelný rozsah potenciálů je širší [7, 31] především v oblasti katodické strany potenciálového okna [5, 18]. Nicméně pro elektroanalýzu nemá toto rozšíření zpravidla význam, jelikož snížená kinetika ovlivňuje i potenciály oxidace/redukce elektro-aktivních látek. Látky oxidovatelné/redukovatelné mimo rozsah potenciálového okna elektrody na více vodivých elektrodách zůstávají mimo rozsah i v rozšířených potenciálových oknech polovodivých elektrod.

1.2 Využití borem dopovaných diamantových elektrod v elektroanalýze organických sloučenin

Jak již bylo zmíněno, využití BDD elektrod je různorodé, elektroanalýza patří spolu s využitím při čištění odpadních vod k velmi progresivním směrům. Přehledy shrnující pokroky v oblasti organické elektroanalýzy [10 - 14], vyzdvihují nízkou náchylnost k pasivaci povrchu a jeho snadnou elektrochemickou obnovu přímo v analyzovaném prostředí. Nízká citlivost k redukci rozpuštěného kyslíku není tak často zmiňována vzhledem k menšímu množství studií věnovaných redukovatelným látkám. U těch

je nejčastějším redoxním centrem nitroskupina na aromatickém jádře [7, 32 - 34] nebo azo skupina [35 - 37]. Mezi studované oxidovatelné analyty patří aromatické aminy [5, 38], fenoly [39] nebo thioly. Tyto skupiny jsou zastoupeny v celé řadě farmaceuticky aktivních látek, pesticidů, potravin a potravinových doplňků, výbušnin. látek vznikajících v důsledku znečištění životního prostředí apod. Jsou také přítomny v aminokyselinách a dávají tak základ elektrochemické aktivitě proteinů.

V této disertační práci bude z oxidovatelných analytů zmíněna elektrochemická studie kresolů, které se řadí mezi fenolické látky (*p*-kresol a *o*-kresol) [1], spolu s vývojem voltametrických a průtokových metod pro jejich detekci. Redukovatelné látky jsou zastoupeny syntetizovanými deriváty nukleosidů (7-deazaadenosin a 2'-deoxycytidin značené 4-nitrofenyltriazolem, u kterých bylo sledováno elektrochemické a adsorpční chování [2].

1.2.1 Fenolické látky

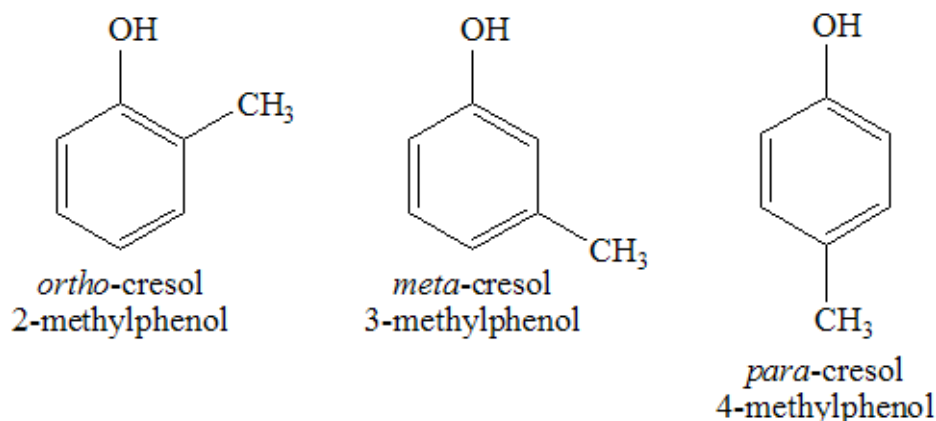
Fenolické látky jsou běžně používány při výrobě pesticidů, plastů, barviv nebo dezinfekčních přípravků [40]. Řada fenolických látek patří mezi endokrinní disruptory jako například 4-nonylfenol, 4-tert-oktylfenol a bisfenol A [41]. Proto jsou průběžně vyvíjeny analytické metody pro jejich citlivou a selektivní detekci v enviromentálních matricích. Mnoho fenolických látek také patří mezi farmaceuticky aktivní substance a jsou tak vyvíjeny metody pro jejich detekci v různých lékových formách.

Elektrochemická detekce nabízí vhodnou alternativu k ostatním detekčním metodám. Během oxidace fenolických látek dochází k pasivaci elektrodového povrchu, která je způsobena následnou reakcí produktů elektrochemické oxidace hydroxylové skupiny, při které vzniká fenoxyl radikál. Vzniklé radikály spolu reagují a tvoří se dimery až polymerní filmy, které pasivují elektrodu [9, 42]. Fenolické látky tak patří v elektrochemii mezi nejproblematictější analyty a na většině elektrodových materiálů je potřeba mezi jednotlivými skeny provádět leštění povrchu, což snižuje uživatelskou přívětivost vyvinutých metod. Díky snadné obnově povrchu anodickou aktivací jsou BDD elektrody vhodným elektrodovým materiálem pro detekci tohoto typu organických látek, neboť elektrochemickou aktivaci lze provádět *in-situ* [12, 31]. Nicméně se mohou použít i jiné výše zmíněné postupy aktivace (viz kapitola 1.1.3), které zajistí opakovatelnost oxidačních signálů příslušného fenolu.

1.2.1.1 Kresoly

Kresoly patří mezi karcinogenní akumulující se polutanty, které představují riziko pro životního prostředí i člověka [43 – 45]. Evropská agentura pro chemické látky (ECHA) udává v bezpečnostní klasifikaci, že se jedná o látky toxické při spolknutí, při kontaktu s kůží mohou způsobit vážné popáleniny a poškození očí. Klasifikace poskytovaná agentuře ECHA v registrech podle nařízení REACH rovněž naznačuje, že tato látka je chronicky toxická pro vodní organismy (*p*- a *o*- kresol) [44, 45] Existují tři typy izomerů lišící se polohou methylové skupiny vůči fenolické OH skupině (struktury viz obr. 1). Tyto izomery mají velmi podobné chemické vlastnosti např. disociační konstantu (*o*-kresol $pK_a = 10,29$, *m*-kresol $pK_a = 10,09$, *p*-kresol $pK_a = 10,26$) [46]. Směs těchto izomerů se do přírody dostává přes odpadní vody z průmyslové výroby, jelikož se používají při výrobě barev, plastů a herbicidů [47]. Mimo to je *o*-kresol používán jako specifický biomarker pro diagnostiku expozice toluenem [48]. Všechny izomery kresolu jsou sekundárními metabolity toluenu, nicméně *o*-kresol je nejvíce zastoupen, *m*-kresol je zastoupen nejméně a jeho detekce se tedy nepoužívá [49]. Z některých studií vyplývá, že je možná chronická intoxikace organismu kresoly u kuřáků, u nichž byl *o*-kresol detekován v moči [50, 51].

Analytické metody běžně využívané pro detekci kresolů jsou stejné jako pro další fenolické látky, např.: kapalinová chromatografie s DAD nebo s tandemovou hmotnostní spektrometrií nebo plynová chromatografie s hmotnostní detekcí nebo FID [49, 51, 52]. Elektrochemické metody mají omezené možnosti stanovení jednotlivých kresolů ve směsi, jelikož jejich redoxní potenciály jsou velmi blízké. Proto je vhodné pro jejich stanovení a identifikaci použít před elektrochemickou detekcí separační krok [1]. Pro zvýšení citlivosti a selektivity elektrody byla v některých studiích použita modifikace povrchu elektrody [53]. Pro předejití pasivace elektrodového povrchu bylo v některých studiích použito elektroaktivních polymerů nanesených na elektroaktivní povrch elektrody zabraňujícím pasivaci povrchu [54].



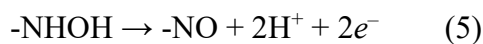
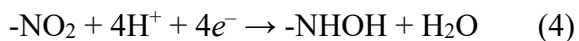
Obr. 1: Strukturní vzorce izomerů kresolu

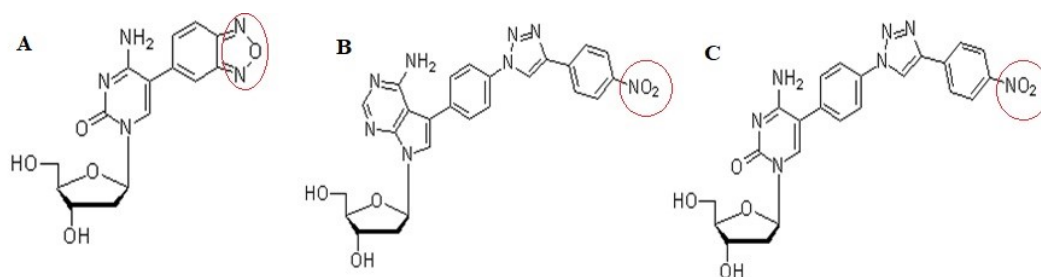
1.2.2 Elektroanalýza DNA a jejích komponent

První elektrochemické studie DNA probíhaly v 50. letech 20. století. Byly prováděny na rtuťových elektrodách, které se vyznačují širokým rozsahem potenciálového okna v katodické oblasti a umožňují tak sledovat elektrochemické redukce i pro děje s vysoce záporným redoxním potenciálem [55]. Toxicita rtuti vedoucí v některých zemích k vytlačení těchto elektrod z laboratoří, podnítila studium možností jejich nahrazení. Redoxní reakce DNA a jejích komponent byly studovány na mnoha dalších elektrodových materiálech (např.: uhlíkových materiálech jako je PGE [56], BDD [57] a GCE [58]). Pro sledování redukčních dějů se využívá elektrod na bázi amalgámů. I když pro mnohé např.: katalytické děje v katodické oblasti je rtuť nenahraditelná. Uhlíkové elektrody jsou s výhodou používány převážně pro studium oxidačních procesů. Obecně platí, že nukleové kyseliny jsou elektrochemicky aktivní při poměrně vysoce kladných/záporných potenciálech. Jejich signál je tak často deformován únikem základního elektrolytu nebo není na daném elektrodovém materiálu zaznamenatelný. Běžně je sledován pík guaninu, jelikož potenciál jeho oxidace je nejbližší k nule a pík adeninu, jehož oxidační potenciál je podobný guaninu [58]. V oblasti záporných potenciálů lze sledovat redukci cytosinu a adeninu (tzv. CA pík). Tento signál byl zaznamenán na rtuťových a amalgámových elektrodách [59], ale i na PGE [56]. Všechny tyto redoxní signály složek jsou elektrochemicky ireversibilní nicméně lze zachytit také oxidaci redukčních produktů adeninu a cytosinu [56]. Používají se například pro studie poškození DNA, které hraje významnou roli ve stárnutí, ale může být také například znakem karcinogenního onemocnění. Proto se v posledních letech

tématem snadné a levné identifikace poškození DNA zabývá mnoho odborných skupin. Na borem dopovaných diamantových elektrodách byly provedeny studie nukleových bází [60], nukleotid monofosfátů [57] a jednořetězcové i dvouřetězcové DNA [61]. Ve všech případech byla pozorována oxidace komponent odvozených od guaninu a adeninu. Zdá se, že zatímco volné nukleové báze se na povrch BDD neadsorbují, bez ohledu na jeho terminaci, všechny ostatní formy ano (nukleotidy, nukleosidy, jednořetězcová a dvouřetězcová DNA). Tohoto jevu je možné využít pro snadnější detekci DNA nukleosidů pomocí adsorpčních technik [2]. Obtíže při detekci DNA nukleotidů byly zjištěny u thymidin a cytidin 5'-monofosfátů, které jsou sice zaznamenatelné na H- a O-terminované BDD elektrodě v prostředí pH 7,0, avšak jejich oxidační potenciály jsou blízko sebe a je tak znesnadněna jejich identifikace či kvantifikace [57]. Problém umístění redoxních signálů na konci potenciálového okna lze řešit pomocí značení redoxními značkami. Tímto postupem je dosaženo snadnější a citlivější detekce nukleotidů, nukleosidů nebo samotné DNA. Jako snadno redukovatelné či oxidovatelné značky (skupiny) byly použity např. benzofurazan [62] a fenylazid [63], které byly detekovány na různých typech rtuťových elektrod [62], amalgámových elektrod [63] nebo elektrod z pyrolytického grafitu [62].

V této disertační práci jsou shrnuty výsledky testování leštěné BDD elektrody pro voltametrickou analýzu 2'-deoxycytidinu a 7-deazaadenosinu značených benzofurazánem nebo 4-nitrofenyltriazolem (obr. 2). 4-Nitrofenyltriazol obsahuje snadno redukovatelnou nitroskupinu, která se v neutrálním a zásaditém prostředí redukuje na hydroxylamin (rovnice 4). Hydroxylamin je v kyselých prostředích dále redukován dvěma elektrony na amin (rovnice 5) [64 - 66] Pro porovnání výsledků byla použita elektroda z pyrolytického grafitu.





Obr. 2: Strukturní vzorce studovaných značených nukleosidů s vyznačenými redukovatelnými skupinami: (A) 2'-deoxycytidin značený benzofurazanem (dC^{BF}), (B) 7-dezaadenosin značený 4-nitrofenyltriazolem (dA^{TRNO2}), (C) 2'-deoxycytidin značený 4-nitrofenyltriazolem (dC^{TRNO2}).

2 Experimentální část

2.1 Použité BDD elektrody a aparatura pro voltametrická a amperometrická měření

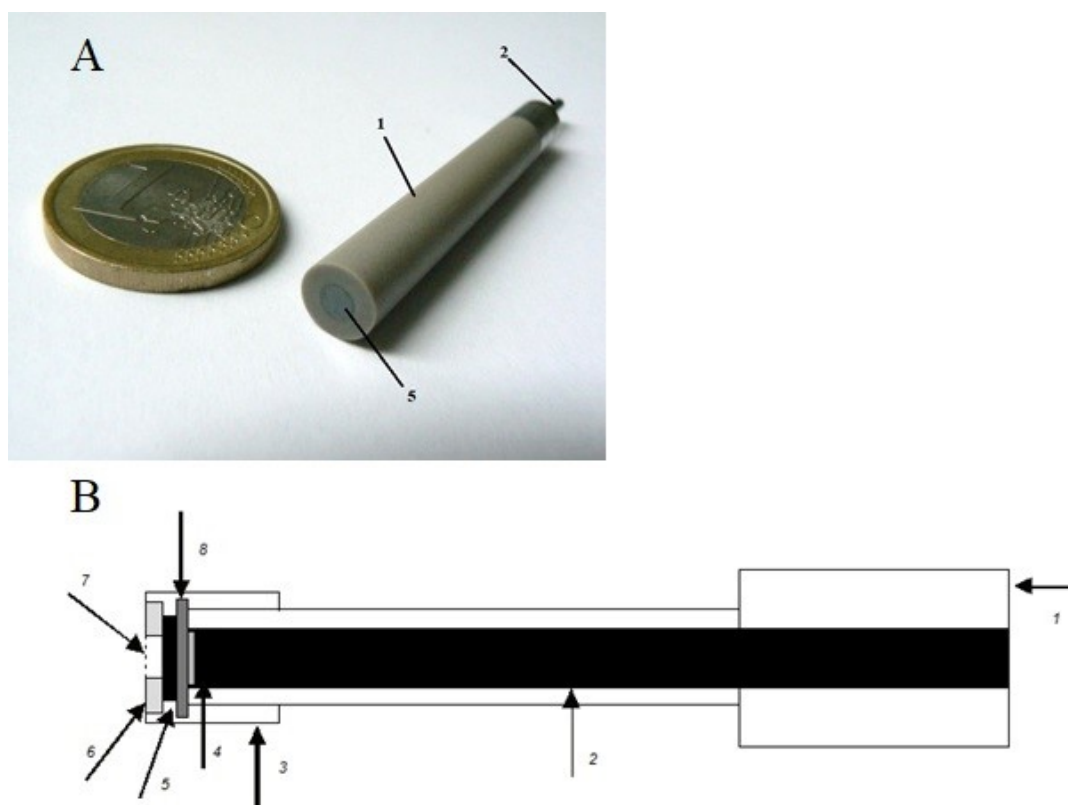
V této práci byly použity dva typy BDD elektrod (viz obr. 3): Komerční BDD elektroda od firmy Windsor Scientific (Slough, Velká Británie) s obsahem boru B/C 1000 ppm a průměrem diamantového disku 3 mm ($S = 7,1 \text{ mm}^2$). A disková elektroda připravená v laboratoři s možnou výměnou BDD disků s průměrem 2,7 mm ($S = 5,72 \text{ mm}^2$). Poměr B/C v plynné fázi při přípravě výměnných disků pomocí CVD byl 500 ppm, 1000 ppm, 4000 ppm a 8000 ppm. Jako substrát pro depozici diamantového filmu byl použit p-křemík (ON Semiconductors, Rožnov pod Radhoštěm). Křemíkové destičky s deponovaným BDD filmem byly zmenšeny tak, aby je bylo možné vsadit do teflonového těla diskové elektrody. BDD destičky byly připraveny ve Fyzikálním ústavu Akademie věd České republiky (FZU AV ČR) v Oddělení funkčních materiálů chemickou depozicí par s mikrovlnným ohřevem dle dříve uvedeného postupu [5, 31]. Tyto BDD disky byly elektrochemicky, morfologicky a spektrálně charakterizovány v pracích [3, 5] na kterých se autorka spolupodílela. Dalšími uhlíkovými elektrodami, které byly pro studii využity jsou uvedeny následně. Elektroda z pyrolytického grafitu (PGE) se čtvercovou elektroaktivní plochou o hraně 3 mm ($S = 9 \text{ mm}^2$) (vyrobena na Biofyzikálním ústavu AV ČR, Brno), která byla využita při studii značených nukleosidů a při studii elektrochemického chování kresolů. Při studii elektrochemického chování kresolů byly dále využity další elektrody na bázi uhlíku, GCE (Metrohm, Švýcarsko) a CPE (připravena smícháním 100 μl minerálního oleje (Fluka) s 250 mg mikročástic skelného uhlíku o velikosti 0,4 až 12 μm (Alfa Aesar, USA)) obě s průměrem elektroaktivní plochy 2 mm ($S = 3,1 \text{ mm}^2$).

Veškeré elektrochemické studie byly provedeny v klasickém tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektrody byly použity výše vyjmenované typy uhlíkových elektrod, $\text{Ag} | \text{AgCl} | 3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \text{ KCl}$ jako referentní elektroda a pomocná elektroda platinová. Pro voltametrické studie byl použit potenciostat Autolab se softwarem Nova 1.11 a 2.0 (Metrohm, ČR).

HPLC systém použitý ve studii fenolických látek byl sestaven z gradientového boxu s degasserem ECB2004, analytické pumpy ECP2010, UV-VIS detektoru ECD2800 (vše

ECOM, Praha, ČR) a amperometrického detektoru ADLC 2 v sériovém zapojení. Pro separaci analytů byla použita kolona Purospher RP-18, (125 x 4 mm, 5 μ m) s předkolonou RP-18 (4 x 4 mm, 5 μ m) (obě Merck, Německo). V amperometrickém detektoru byly použity tyto elektrody: BDD elektroda diskového typu s B/C 4000 ppm, Ag | AgCl | 3 mol·l⁻¹ KCl jako referentní elektroda a pomocná elektroda platinová.

Zpracování dat bylo provedeno v softwaru Origin 8. Hodnoty meze detekce (LOD) byly vypočítány jako trojnásobek standardní odchylky výšky píku pro nejnížší naměřenou hodnotu kalibrační závislosti.



Obr. 3: (A) Fotografie komerčně dodávané elektrody od firmy Windsor Scientific, VB; (B) schéma BDD elektrody připravené v laboratoři, (1) tělo z polyetheretherketonu pro (A) nebo teflonu pro (B), (2) elektrický kontakt, (3) šroubovací nástavec, (4) mosazný plíšek, (5) BDD film na křemíkové podložce (vyměnitelný v případě B), (6) těsnění z vitonu, (7) otvor vymezující plochu elektrody, (8) mosazný plíšek.

2.2 Pracovní postupy

2.2.1 Elektrochemická studie kresolů

Zásobní roztoky *o*- a *p*- kresolu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním v deionizované vodě a uchovávány ve tmě. Jako základní elektrolyt pro veškerá elektrochemická měření byl použit BR pufr. Koncentrace všech kyselin (kyselina fosforečná, kyselina octová, kyselina boritá) v BR pufru byla $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Před počátkem každé série měření bylo pH kyselé složky upraveno na požadovanou hodnotu přidáním $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH. Zásobní roztoky analytů byly pro měření ředěny základním elektrolytem na výslednou koncentraci $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Všechny pracovní BDD elektrody byly polarizovány v $0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ kyselině sírové vložením potenciálu $+2,5 \text{ V}$ po dobu pěti minut pro prvotní čištění. Při optimalizovaném postupu voltametrické detekce byl povrch elektrod mezi jednotlivými skeny čištěn vložením potenciálu $+2,5 \text{ V}$ po dobu jedné minuty s mícháním roztoku pro odstranění produktů polymerizace z povrchu elektrody. Naměřené křivky byly vyhlazeny pomocí Savitzky-Golay filtru (stupeň 4).

Vzorky říční vody pocházející z řeky Vltavy byly filtrovány přes plastovou injekční stříkačku s nylonovým mikrofiltrem o porozitě $0,45 \text{ } \mu\text{m}$ a následně byly 10x zředěny BR pufrém o pH 2,0. Takto připravené vzorky byly dány přímo aplikovány do chromatografického systému. Jako mobilní fáze byla použita směs BR pufru o pH 2,0 a acetonitrilu v poměru 60:40 (v/v), standardní nástřík byl $20 \text{ } \mu\text{l}$, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. UV detekce probíhala při 280 nm . Pro elektrochemickou detekci byl zvolen potenciál $+1,6 \text{ V}$. Obsahy fenolických polutantů v modelovém vzorku říční vody byly stanoveny metodou standardního přídatku, kdy byla ke vzorku říční vody přidána směs fenolických polutantů o známé koncentraci ($10,5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$).

2.2.2 Voltametrická a adsorpční studie DNA nukleosidů značených redukovatelnými redoxními značkami

Pro studii značených nukleosidů byl použit benzofurazanem značený 2'-deoxycytidin (dC^{BF}), 4-nitrofenyltriazolem značený 7-deazaadenosin ($\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$) a 4-nitrofenyltriazolem značený 2'-deoxycytidin ($\text{dC}^{\text{TRNO}_2}$). Dále byla studována dvouvláknová DNA jejíž báze cytosin byla značena 4-nitrofenyltriazolem. Všechny použité značené nukleosidy a DNA byly syntetizovány ve skupině M. Hocka na Ústavu

organické chemie a biochemie AV ČR. Pro syntézu DNA byla použita metodika PEX, kdy byl použit značený primer (5'-CTA GGG CGG ACT GGG-3') a delší komplementární templát (5'-CAT GCA TGA CGT CAG T CC CAG TCC GCC CTA G-3') [67]. Zásobní roztoky 4-nitrofenylacetátu a 2-nitronaftlenu o koncentraci $4,08 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly připraveny v dimethylsulfoxidu. Zásobní roztoky značených nukleosidů a DNA byly připraveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu, rozlity do mikrozkušavek po malých množstvích, aby bylo zabráněno degradaci analytů častou změnou teploty a skladovány v mrazničce při teplotě -20°C . K přípravě roztoku dvouvláknové DNA byla použita směs vody a $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NaCl}$. Koncentrace všech zásobních roztoků značených nukleosidů a DNA byla přibližně $1,3 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Pro elektrochemickou studii byly zásobní roztoky značených nukleosidů a DNA zředěny na objem 2 ml pomocí $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanového pufru o pH 5,0, na koncentraci analytu $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Octanový pufr byl připraven smícháním octanu sodného a kyseliny octové. V takto připravených laboratorních vzorcích byla prováděna elektrochemická studie značených nukleosidů. Pro aktivaci elektrody bylo použito leštění aluminou ($0,5 \text{ }\mu\text{m}$) na leštící podložce po optimalizované dobu 30 s. Pro odstranění rozpuštěného kyslíku v analyzovaných roztocích byl použit plynný dusík. Měření pomocí SW voltametrie probíhalo za podmínek amplituda 50 mV, krok 5 mV, frekvence 200 Hz.

3 Výsledky a diskuze

V následující části práce jsou shrnuty postupy a výsledky jednotlivých studií provedených s BDD elektrodami opublikovaných v příspěvcích [1, 2].

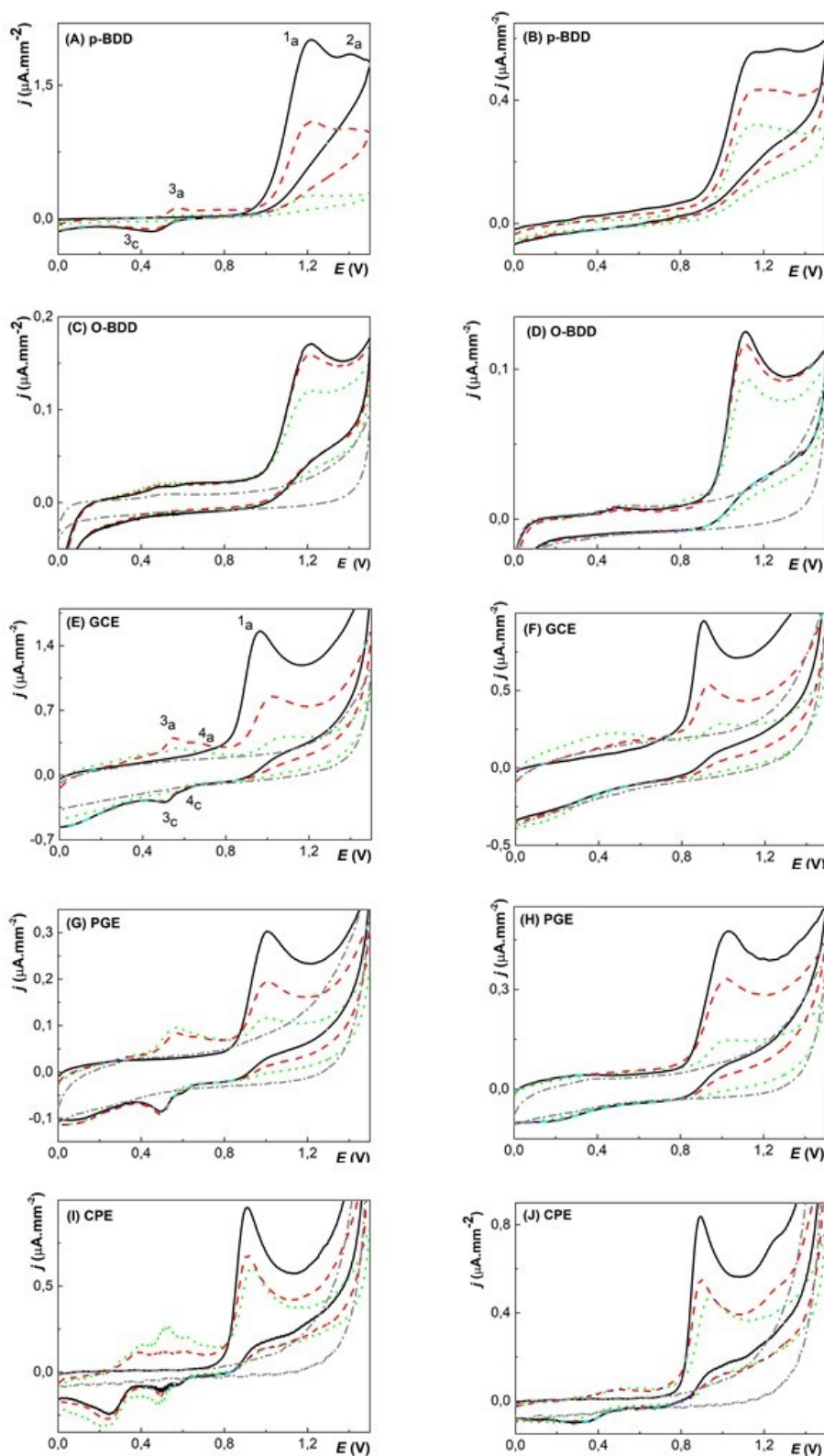
3.1 Elektrochemická studie izomerů kresolu

Elektrochemická studie *o*- a *p*- izomeru kresolu se sestávala ze tří částí. Nejprve byla provedena voltametrická studie těchto izomerů a byl porovnán oxidační potenciál, proudová odezva a intenzita pasivace elektrodového povrchu s ohledem na mechanismus elektrodové reakce (kapitola 2.2.1). Následně byly optimalizovány parametry voltametrické metody pro stanovení izomerů kresolu (kapitola 3.1.2.). V závěrečné části studie byla pro kvalitativní a kvantitativní analýzu fenolických polutantů včetně *o*- a *p*- kresolu použita metoda HPLC s detekční průtokovou celou v uspořádání wall-jet s BDD elektrodou (kapitola 3.1.4).

3.1.1 Porovnání elektrochemického chování izomerů kresolu na různých typech uhlíkových elektrod

Pro porovnání elektrochemického chování vybraných izomerů kresolu bylo použito pět typů uhlíkových elektrod. Použité typy elektrod byly komerční BDD elektroda s úpravou povrchu pomocí leštění (obr. 3A), BDD elektroda s úpravou povrchu anodickou aktivací (O-terminovaná) (obr. 3B), skleněná uhlíková elektroda, uhlíková pastová elektroda a elektroda z pyrolytického grafitu. Rozměry elektroaktivních ploch použitých elektrod jsou uvedeny v předchozí kapitole 2.1. Pro účely porovnání výšky signálů analytů na jednotlivých elektrodách, byly naměřené proudy přepočítány na proudovou hustotu. Všechny použité elektrody na bázi uhlíku podléhají během oxidace fenolických látek pasivaci elektrodového povrchu. U všech typů použitých uhlíkových elektrod lze poměrně snadno obnovit elektrodový povrch. Pro komerční BDD elektrodu a GCE bylo pro obnovu elektrodového povrchu a předpřípravu elektrody použito leštění na alumině. U PGE lze pasivovanou vrstvu elektrodového materiálu odtrhnout pomocí lepící pásky po vložení potenciálu +1,7 V po dobu 60 s a následně pokračovat měřením na novém povrchu. Pasivovaná část uhlíkové pastové elektrody je jednoduše vytlačena z elektrodového těla a setřena.

Oba studované izomery kresolu byly sledovány pomocí cyklické voltametrie s rychlostí skenu $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ v prostředí BR pufru o pH 2,0. Na obrázku 4 jsou uvedeny první, druhé a desáté za sebou jdoucí skeny. Z voltamogramů je vidět, že u všech použitých elektrod došlo k poklesu signálu právě vlivem pasivace elektrodového povrchu. Nejmenší snížení proudové odezvy pro oba studované izomery kresolu kvůli pasivaci elektrodového povrchu bylo pozorováno pro CPE a O-terminovanou BDD elektrodu. Oxidační potenciál *p*- a *o*- kresolu je u všech použitých elektrod velmi podobný, pro O-terminovanou a leštěnou BDD elektrodu se nachází v oblasti +1,1 V až +1,2 V (pík 1a, obr.: 4, Tabulka 1). Pro ostatní elektrody na bázi uhlíku byla proudová odezva oxidace *p*- a *o*- kresolu sledována u nepatrně nižších potenciálů v rozmezí cca +0,9 V až +1,0 V (viz shrnutí potenciálů v Tabulce 1). Posun potenciálu oxidace kresolu na methylfenoxy radikál (pík 1a, obr. 4) je dán pomalejším přenosem elektronu na heterogenním povrchu BDD elektrody. Další oxidační signál (pík 2a, obr. 4) při potenciálu cca +1,3 V přísluší zřejmě oxidaci tohoto radikálu na methylfenoxy kationt, která není na ostatních uhlíkových elektrodách s užším potenciálovým oknem a rychlejším přenosem elektronu pozorovatelná. Z uvedených záznamů je zřejmá různá citlivost elektrodových materiálů k redoxnímu páru methylhydrochinon – methylchinon (pík 3c a pík 4c, obr. 4), což jsou výsledné produkty oxidace kresolu, které zapříčiňují pasivaci elektrodového povrchu. Lze také pozorovat, že během snižující se odezvy oxidace kresolu se zvyšuje odezva zmíněného redoxního páru, z čehož lze usuzovat, že k výměně elektronů dochází na povrchu elektrody a je tak zamezen přístup nových molekul kresolu. Samotné postavení methylové skupiny v molekule pravděpodobně ovlivňuje elektrochemickou oxidaci. U izomeru s methylovou skupinou v poloze *para* není výsledný redoxní pár pozorovatelný, pouze u pastové elektrody jsou naznačeny elektrodové odezvy páru methylhydrochinon-methylchinon. Oxidace kresolu s methylovou skupinou v poloze *ortho* může mít více cest, jak napovídá voltametrický záznam pomocí pastové uhlíkové elektrody. Kvůli blízkým redoxním potenciálům obou izomerů kresolu na všech použitých uhlíkových elektrodách (viz tabulka 1) nelze použít voltametrickou detekci bez předchozího separačního kroku. Nejlepší rozlišení *p*- a *o*- kresolu bylo dosaženo při jejich oxidaci pomocí BDD elektrod, a to od cca 0,07 V až 0,09 V, zatímco pro ostatní použité uhlíkové elektrody byl vypočten rozdíl potenciálů menší než 0,05 V.



Obr. 4: Záznamy cyklických voltamogramů od 0 V do 1,5 V s rychlostí polarizace elektrody $0,1 \text{ V s}^{-1}$ pro $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$ *o*-kresol (vlevo) a *p*-kresol (vpravo) v prostředí BR pufru o pH 2,0, první sken (plná čára), druhý sken (čerchovaně) a desátý sken (tečkovaně) pro (A) a (B) leštěná BDD elektroda, (C) a (D) O-terminovaná BDD elektroda, (E) a (F) GCE, (G) a (H) PGE a (I) a (J) CPE. (převzato z Publikace 1)

Tabulka 1: Hodnoty oxidačních potenciálů (E_p) *p*- a *o*- kresolu a jejich rozdíl ΔE_p na různých typech elektrod na bázi uhlíku.

Typ elektrody	<i>o</i> -kresol (E_p , V)	<i>p</i> -kresol (E_p , V)	ΔE_p (V)
O-terminovaná BDD	1,209	1,110	0,099
leštěná BDD	1,134	1,209	0,075
GCE	0,958	0,903	0,055
PGE	1,005	1,029	0,024
CPE	0,907	0,889	0,018

3.1.2 Optimalizace voltametrické metody pro stanovení *o*- a *p*- kresolu

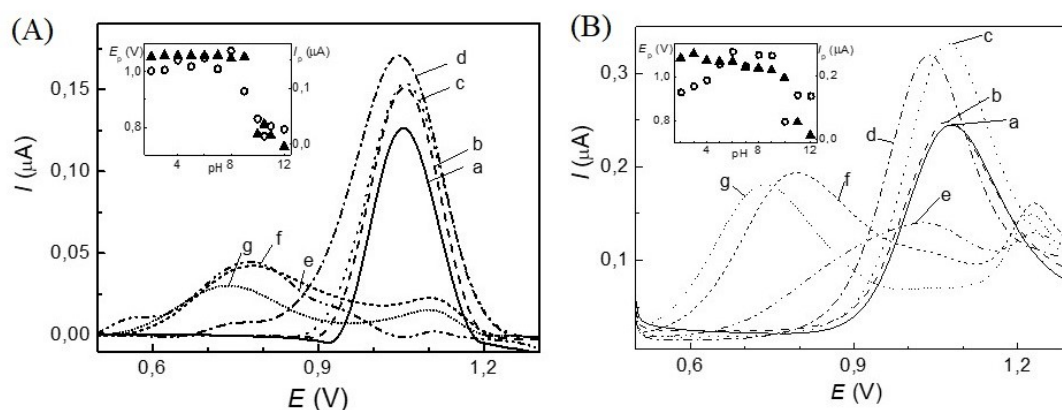
Při optimalizaci voltametrické metody pro stanovení *o*- a *p*- kresolu na BDD elektrodě byl brán zřetel na vliv pH roztoku, předpřípravy a čištění elektrody. Právě obnova elektrodového povrchu je při stanovení fenolických látek podstatná, jak bylo zmíněno v teoretické části (viz kapitola 1.1.3). Jako voltametrické metody byly použity diferenční pulsní (DP) a square wave (SW) voltametrie. Vybrané parametry použitých voltametrických metod jsou následující, DP voltametrie: rychlost skenu $20 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, šířka pulsu 50 mV a výška pulsu +100 mV, a SW voltametrie s amplitudou 0,07 V a frekvencí 25 Hz.

Ke studii byla použita BDD elektroda připravená na FZU AV ČR s B/C poměrem při depozici 8000 ppm a O-terminovaným povrchem. Aktivace povrchu BDD elektrody mezi jednotlivými skeny bylo prováděna optimalizovaným postupem 60ti sekundové polarizace elektrody vložení potenciálu +2,5 V s mícháním roztoku.

Vliv pH roztoku na oxidaci *p*- i *o*- izomeru kresolu byl sledován v prostředí BR pufru v rozsahu pH od 2,0 do 12,0. Byla sledována závislost proudové odezvy a posun redoxního potenciálu analytu na pH základního elektrolytu. Na voltamogramech obr. 5 je vidět, že se zvyšujícím se pH roztoku dochází k posunu oxidačního potenciálu obou kresolů k méně kladným hodnotám a také ke snížení proudové odezvy. Tento trend je zřejmý pro velmi zásadité roztoky o pH 10,0 až 12,0, kdy je vidět výrazný posun k nižším potenciálům, a to až o 250 mV (viz obr. 5). Posun k nižším hodnotám potenciálu v oblasti, kdy je $\text{pH} \geq \text{p}K_a$ je zřejmě způsoben ionizací molekuly kresolu (disociací hydroxylové skupiny získává záporný náboj). Ionizace molekuly vede

ke zvýšení elektronové hustoty a snadnější oxidaci, díky kladně nabitě elektrodě. Dále je v zásaditém prostředí pozorovatelný druhý pík u cca +1,2 V pravděpodobně odpovídající další oxidaci metylfenoxy radikálu na metylfenoxy kationt, jak je popsáno v předchozí kapitole 1.2.1.

Jako optimální prostředí pro další studie bylo vybráno kyselé pH základního elektrolytu o hodnotě 2,0. Při tomto pH nedochází k ionizaci kresolu a elektrodová odezva je dostatečně zřetelná a reprodukovatelná pro oba studované izomery.



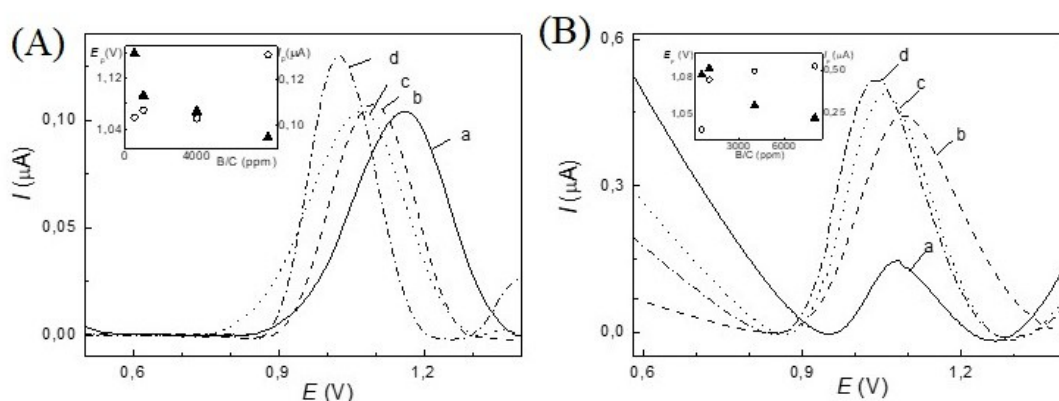
Obr. 5: DP voltamogramy *o*-kresolu (A) a *p*-kresolu (B) (oba o $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřeno na BDD elektrodě B/C 8000 ppm v BR pufru, pH: a) 2,0; b) 4,0; c) 6,0; d) 8,0; e) 10,0; f) 11,0; a g) 12,0. V grafech je vložena závislost potenciálu píku (E_p) a výšky píku (I_p) na pH základního elektrolytu (Převzato z publikace 1).

3.1.3 Vliv koncentrace boru v BDD filmu na oxidaci kresolů

Dále byl v případě BDD elektrod sledován vliv koncentrace boru v BDD filmu na proudovou odezvu *o*- a *p*- kresolu v optimalizovaném prostředí, a to BR pufru o pH 2,0. Pro tuto studii byly použity čtyři BDD disky připravené na FZU AV ČR s různou koncentrací boru při depozici, a to B/C 500 ppm, 1000 ppm, 4000 ppm a 8000 ppm. Koncentrace boru v diamantové elektrodě ovlivňuje kinetiku elektronového přenosu fenolických látek [31, 42]. V mnoha studiích fenolických látek byl pozorován posun potenciálu k nižším hodnotám a zvýšení elektrodové odezvy s rostoucí koncentrací boru v diamantovém filmu [5, 31, 42]. Tak jako v předchozích studiích [7, 31] je patrný rozdíl mezi elektrodami s polovodičovým charakterem (B/C 500 a 1000 ppm) a elektrodami s kovovou vodivostí (B/C 4000 ppm a 8000 ppm). Vliv koncentrace dopantu v diamantovém filmu je patrný na vybraných DP voltamogramech

studovaných kresolů obr. 6. Všechny typy elektrod polovodičového typu i s kovovým charakterem vodivosti vykazují dobře vyvinuté píky oxidace pro oba studované izomery kresolu. Zvyšující se koncentrace boru v BDD filmu má významnější vliv na oxidaci *p*-kresolu než na oxidaci *o*-kresolu. Rozdíl velikosti proudové odezvy *p*-kresolu pro elektrodu s poměrem B/C 500 ppm a 8000 ppm je zhruba dvojnásobný. Dále je vidět mírný posun E_p k nižším hodnotám se zvyšující se vodivostí elektrody, což naznačuje snadnější přenos náboje. Tento jev byl popsán i u dalších fenolických sloučenin [31].

Kalibrační závislosti analytů byly změřeny pro všechny připravené BDD disky, se zvyšující se koncentrací dopantu se zvyšuje jejich citlivost (tj. směrnice kalibrační přímky) k oxidaci analytu (Tabulka 2). Všechny použité BDD elektrody vykazovaly lineární průběh kalibrační přímky a to v rozsahu od 3,0 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vypočítané hodnoty LOD (Tabulka 2) pro obě voltametrické metody jsou v rozsahu 0,61 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ až 2,97 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Nižších hodnot LOD bylo dosaženo obecně při stanovení *p*-kresolu. oběma voltmetrickými metodami. U BDD disků o koncentraci dopantu B/C 500 ppm a 1000 ppm je nižší LOD způsoben polovodičovým charakterem elektrody, kdy dochází ke snížení elektrodové odezvy k oxidaci kresolu (viz kapitola 3.1.3). Všechny použité BDD filmy v obou voltametrických metodách vykazují porovnatelné výsledky, nicméně pro další studii byl vybrán BDD film s B/C 8000 ppm, který vykazoval nejvyšší citlivost k oxidaci kresolů.



Obr. 6: DP voltamogramy *o*-kresolu (A) a *p*-kresolu (B) o koncentraci $1\cdot 10^{-4}$ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v BR pufru pH 2,0, změřené na BDD elektrodách s různým poměrem B/C: (a) 500 ppm, (b) 1000 ppm, (c) 4000 ppm, (d) 8000 ppm. (Převzato z publikace 1)

Tabulka 2: Parametry kalibračních *o*- a *p*- kresolů závislostí pro obě optimalizované metody (SW a DP voltametrie) měřené na čtyřech BDD elektrodách. (Převzato z publikace 1)

B/C poměr (ppm)	Izomer	Rovnice regrese I_p (μA), c (mmol·l ⁻¹)	<i>R</i>	LOD (μmol·l ⁻¹)
DP voltametrie				
500	<i>o</i> -kresol	$I_p = 4,94 \cdot c - 0,024$	0,9945	1,05
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 4,37 \cdot c + 0,105$	0,9991	1,25
1000	<i>o</i> -kresol	$I_p = 6,54 \cdot c - 0,016$	0,9954	1,16
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 6,23 \cdot c + 0,068$	0,9998	1,37
4000	<i>o</i> -kresol	$I_p = 13,16 \cdot c + 0,074$	0,9846	2,67
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 10,84 \cdot c + 0,014$	0,9870	0,74
8000	<i>o</i> -kresol	$I_p = 14,75 \cdot c + 0,010$	0,9897	2,63
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 10,66 \cdot c + 0,084$	0,9970	0,61
SW voltametrie				
500	<i>o</i> -kresol	$I_p = 6,15 \cdot c - 0,022$	0,9912	1,01
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 5,13 \cdot c + 0,004$	0,9938	0,69
1000	<i>o</i> -kresol	$I_p = 9,48 \cdot c - 0,024$	0,9957	1,07
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 7,73 \cdot c - 0,003$	0,9981	1,06
4000	<i>o</i> -kresol	$I_p = 13,8 \cdot c + 0,017$	0,9857	2,58
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 9,6 \cdot c - 0,019$	0,9899	1,3
8000	<i>o</i> -kresol	$I_p = 15,05 \cdot c - 0,053$	0,9895	2,97
	<i>p</i> -kresol	$I_p = 11,09 \cdot c - 0,019$	0,9872	1,52

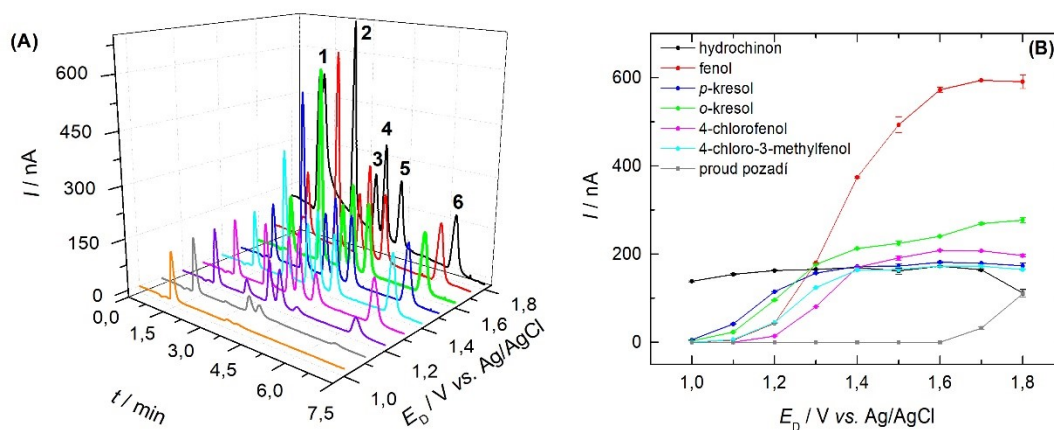
3.1.4 HPLC s amperometrickou detekcí na O-terminované BDD elektrodě

BDD elektroda s poměrem B/C při depozici 8000 ppm byla vybrána pro amperometrickou detekci směsi fenolických látek po separaci pomocí HPLC. Jako mobilní fáze byla použita směs BR pufru a acetonitrilu (ACN) v poměru 60:40 (v/v). Vzhledem k tomu, že mobilní fáze obsahovala acetonitril, byl nejprve sledován jeho vliv na voltametrickou odezvu obou kresolů pomocí cyklické voltametrie v rozsahu 0 % obj. až 50 % obj. acetonitrilu v měřeném roztoku (BR pufr o pH 2,0 s obsahem kresolu $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). S postupným zvýšením obsahu acetonitrilu byl pozorován mírný posun oxidačního potenciálu ke kladnějším hodnotám v rozsahu 1,1 V až 1,5 V. Dále byl sledován vliv přítomnosti ACN na pasivaci elektroaktivní plochy BDD elektrody. Od přídavku ≥ 30 % ACN do sledovaného roztoku kresolu se snižuje pasivace elektrodového povrchu o cca 20 %. Pro nižší obsahy ACN (do 20 % obj.) dochází k poklesu signálu vlivem pasivace elektrodového povrchu až o 60 %. Z naměřených hodnot vyplývá, že roztoky obsahující více než 20 % obj. ACN přispívají ke snížení pasivace BDD elektrod.

Modelová směs fenolických polutantů, které se běžně vyskytují v odpadních vodách a mohou tak kontaminovat i vody říční, byla separována na koloně RP C18 s isokratickou elucí (kapitola 2.1). Ve směsi byly obsaženy tyto fenolické látky: fenol, hydrochinon, *o*- a *p*- izomery kresolu, 4-chlorofenol a 4-chlor-3-methylfenol. Pro porovnání byla také použita detekce spektrometrická UV – VIS při $\lambda = 280$ nm. Úplné separace složek bylo dosaženo v čase 7,0 minut s následujícím pořadím eluce analytů (v závorce uveden retenční faktor): hydrochinoin (0,53), fenol (1,82), *p*-kresol (2,77), *o*-kresol (3,17), 4-chlorofenol (3,80) a 4-chloro-3-methylfenol (5,91) (viz chromatogramy obr. 7A). Detekční potenciál vkládaný na pracovní elektrodu byl optimalizován v rozsahu +1,0 V až +1,8 V (viz hydrodynamické voltamogramy obr. 7B), v tomto rozsahu potenciálů dochází k oxidaci všech vybraných analytů. Při vložení potenciálu vyššího než +1,6 V dochází ke zvýšení pozadí a deformaci píků analytů. Jako optimální detekční potenciál byl zvolen potenciál o hodnotě +1,6 V, kdy bylo dosaženo stabilního pozadí a největšího proudového rozdílu mezi proudem pozadí a maximem signálu. Konstrukce detekční wall-jet cely, kdy pracovní elektroda je umístěna přímo nad vývodní kapilárou, o průměru 0,15 mm, ve vzdálenosti 0,5 mm od kapiláry umožňuje kontinuální čištění průtokem mobilní fáze a stabilní odezvu bez nutnosti aktivace elektrodového povrchu. Za optimalizovaných podmínek separace

a amperometrické detekce byly změřeny kalibrační závislosti pro vybrané fenolické látky. Parametry kalibračních závislostí byly vypočítány z výšek i ploch elučních píků pro oba typy detekce, spektrometrickou i amperometrickou, a jsou uvedeny v Tabulce 3. Z dosažených výsledků je zřejmé, že O-terminovaná BDD elektroda o poměru B/C 8000 ppm v průtokové detekci je dostatečně citlivá pro stanovení fenolických látek i bez modifikace či čištění elektrodového povrchu v průběhu analýzy.

HPLC-ED a HPLC-UV byly použity ke stanovení koncentrace studovaných fenolických látek v modelových vzorcích říční vody. Pro *o*- a *p*-kresol byly analyzovány modelové vzorky říční vody i DP voltametrií. V přefiltrovaném vzorku říční vody nebyl detekován žádný ze sledovaných polutantů. Výsledky ze stanovení vybraných polutantů v připravených modelových vzorcích říční vody jsou uvedeny v Tabulce 3. Obsah vybraných polutantů byl vypočítán z ploch i výšek píků. Výsledky v tabulce jsou uvedeny s intervalem spolehlivosti (pro $\alpha = 0,05$) a relativní směrodatnou odchylkou. Výsledky získané pomocí ED i UV detekce nejsou statisticky odlišné na hladině pravděpodobnosti 95 %. (Studentův *t*- test). Z uvedených výsledků je zřejmé, že ani jedna z použitých technik není vhodná pro stanovení hydrochinonu, které je ovlivněno neznámou látkou z matrice modelového vzorku říční vody. Pro ostatní analyty jsou změřené koncentrace ve shodě s koncentrací vypočítanou v připraveném modelovém vzorku. Pro *o*-kresol byla naměřená koncentrace vypočítaná z výšky píku ($9,67 \pm 1,80$) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, pro *p*-kresol ($10,45 \pm 2,57$) $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Ačkoliv je metoda DP voltametrie méně přesná než chromatografické metody, pro oba izomery kresolu poskytuje správný výsledek.



Obr. 7: (A) Chromatogramy směsi fenolických polutantů (všechny $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zaznamenaný s různým vloženým potenciálem detekce E_d , pořadí eluce analytů: (1) hydrochinon, (2) fenol, (3) *p*-kresol, (4) *o*-kresol, (5) 4-chlorofenol a (6) 4-chloro-3-methylfenol. (Převzato z publikace 1)

(B) Hydrodynamické voltamogramy vybraných fenolických polutantů (všechny $c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) a závislost proudu pozadí na vloženém detekčním potenciálu E_d , měřeno na O-terminované BDD elektrodě (B/C 8000 ppm). Chybové úsečky reprezentují standardní odchylku ($n = 4$). Měřeno pomocí HPLC s wall-jet detekční celou, kolona RP-18, ($5 \mu\text{m} \times 125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$), mobilní fáze BR pufr o pH 2,0 s ACN (60:40, % v/v), isokratická eluce, objem nástřiku $20 \mu\text{l}$, průtok mobilní fáze $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. (Převzato z publikace 1)

Tabulka 3: Výsledky stanovení modelové směsi vybraných fenolických polutantů ve vzorku říční vody, získané pomocí metody HPLC se spektrometrickou detekcí ($\lambda = 280$ nm) a HPLC s amperometrickou detekcí na O-terminované BDD elektrodě ($E_d = +1,6$ V). V tabulce jsou uvedeny výsledky koncentrace jednotlivých analytů s intervalem spolehlivosti (pro $\alpha = 0,05$), pod jednotlivými výsledky je uvedena vypočítaná RSD. (Převzato z publikace 1)

analyt	přídavek	Vypočítaný obsah fenolických polutantů			
	c ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	c ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			
		HPLC-UV		HPLC-ED	
		Plocha píku	Výška píku	Plocha píku	Výška píku
hydrochinon	10,50	$7,11 \pm 0,33$	$8,64 \pm 0,44$	$8,28 \pm 0,10$	$9,75 \pm 0,20$
		(3,72 %)	(4,10 %)	(0,93 %)	(1,69 %)
fenol	10,50	$10,12 \pm 0,16$	$10,52 \pm 0,15$	$10,49 \pm 0,24$	$10,54 \pm 0,17$
		(1,26 %)	(1,18 %)	(1,85 %)	(1,28 %)
<i>p</i> -kresol	10,50	$10,58 \pm 0,46$	$10,77 \pm 0,15$	$10,77 \pm 0,42$	$10,97 \pm 0,25$
		(3,52 %)	(1,15 %)	(3,17 %)	(1,85 %)
<i>o</i> -kresol	10,50	$10,13 \pm 0,18$	$10,32 \pm 0,05$	$10,37 \pm 0,28$	$10,44 \pm 0,14$
		(1,46 %)	(0,38 %)	(2,18 %)	(1,11 %)
4-chlorofenol	10,50	$10,37 \pm 0,26$	$10,65 \pm 0,14$	$10,73 \pm 0,20$	$10,74 \pm 0,18$
		(1,99 %)	(1,03 %)	(1,52 %)	(1,37 %)
4-chloro-3-methylfenol	10,50	$10,30 \pm 0,44$	$10,70 \pm 0,33$	$10,55 \pm 0,29$	$10,57 \pm 0,21$
		(3,47 %)	(2,49 %)	(2,21 %)	(1,60 %)

3.1.5 Závěr

Studie *para* a *ortho* izomerů kresolů na uhlíkových elektrodách vykazala mírné rozdíly průběhu elektrochemické reakce. Všechny použité uhlíkové elektrody (BDD, PGE, CPE, GCE) vykazují dobře vyvinutý oxidační pík při potenciálu v rozmezí 0,9 V až 1,2 V, který přísluší oxidaci příslušného kresolu na methylfenoxy radikál. Následné reakce vedou ke vzniku hydrochinonů/chinonů, které se v různé míře adsorbují na povrch elektrod, výrazněji pro *o*-kresol než pro *p*-kresol, což svědčí o odlišné struktuře těchto produktů. Ta je dána variabilitou mezomerních struktur reakčních meziproduktů v závislosti na struktuře výchozího kresolu. Redoxní pár produktů oxidace (strukтуры typu chinon/hydrochinon) nebyl u BDD elektrod pozorován ani pro jeden sledovaný izomer, což svědčí o malé náchylnosti k adsorpci produktů oxidace kresolu na těchto površích. Největšího rozlišení píků kresolů bylo dosaženo v případě leštěné BDD elektrody a O-terminované BDD elektrody. Díky snadné elektrochemické obnově *in-situ* je O-terminovaná BDD elektroda vhodnějším materiálem pro detekci kresolů. Výrazný vliv na výšku oxidačního signálu má koncentrace boru v BDD filmu, jak bylo prokázáno pro sadu elektrod deponovaných při B/C v rozmezí 500 ppm až 8000 ppm. Vyvinutá DP voltametrická metoda na elektrodě deponované při B/C 8000 ppm má limit detekce $0,61 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, což je porovnatelné s limity detekce na různých typech modifikovaných uhlíkových elektrod. Pro detekci vybraných fenolických látek po předchozí HPLC separaci lze BDD elektrodu použít jako pracovní elektrodu v průtokovém wall-jet detektoru. V tomto případě není nutné její povrch aktivovat po každém nástřiku, jelikož povrch elektrody je od produktů a meziproduktů oxidace čištěn průběžně díky omývání mobilní fází. Pokud se v analyzovaném vzorku nachází hydrochinon, je příhodnější použít amperometrickou detekci než UV detekci, dochází k menšímu ovlivnění signálu maticí. Všechny vyvinuté metody (DPV, HPLC-ED a HPLC-UV) vykazují správné výsledky při stanovení modelových vzorků.

3.2 Voltametrická a adsorpční studie DNA nukleosidů značených redukovatelnými redoxními značkami

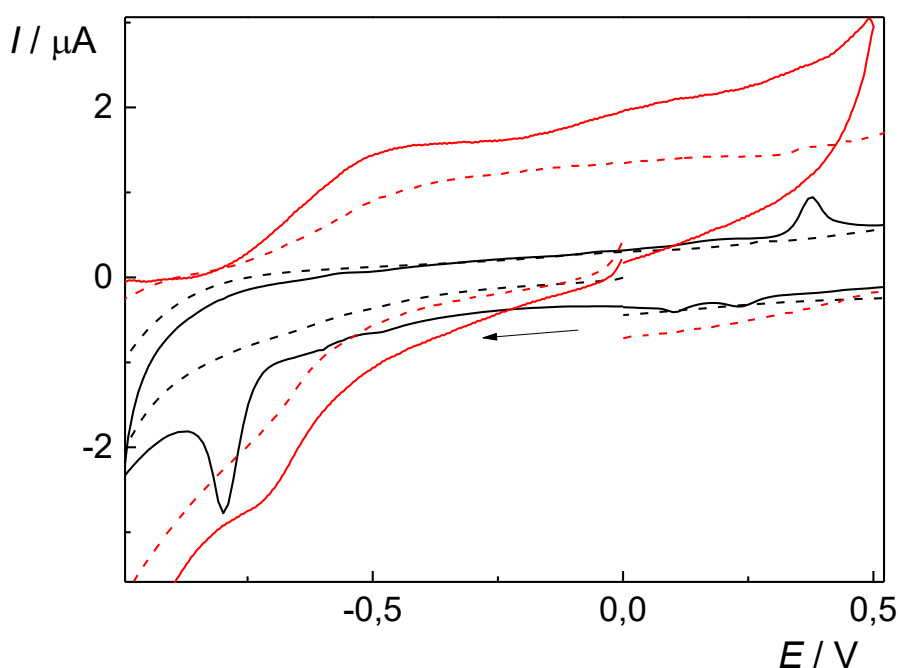
Pro elektrochemickou studii nukleosidů DNA byla zvolena komerční BDD elektroda od firmy Windsor Scientific (B/C = 1000 ppm) (obr. 3A). U tohoto typu elektrody je možné uplatnit mechanickou obnovu elektrodového povrchu leštěním, jelikož BDD disk je vlepen do těla elektrody tak, aby s ním byl v jedné rovině. Optimální doba leštění, aby bylo dosaženo dostačující reprodukovatelnosti elektrochemické odezvy byla stanovena na dobu 30 s. Elektroda z pyrolytického grafitu, která byla použita pro měření značených nukleosidů a DNA byla použita pro kontrolní měření [56, 62]. PGE se před samotným použitím aktivuje vložením potenciálu +1,7 V po dobu 60ti sekund, poté je povrch elektrody osušen a vrchní vrstva uhlíků se sloupne pomocí kancelářské lepicí pásky. Pro elektrochemickou studii značených nukleosidů byla použita cyklická voltametrie a SW voltametrie s optimalizovanými parametry: frekvencí 200 Hz, amplitudou 50 mV a krokem 5 mV. Dále byla provedena studie tzv. adsorbčních transferových procesů, kdy je molekula samovolně adsorbována na povrch elektrody z jednoho prostředí a poté je elektroda s naadsorbovanou molekulou přenesena do čistého základního elektrolytu, kde je následně provedeno voltametrické měření. Tento postup je poměrně běžný na uhlíkových nebo rtuťových elektrodách [68] u BDD elektrod však představuje ojedinělý přístup [15, 69, 70]. Samovolná adsorpce na BDD povrchy je obecně popsána pro některé větší organické molekuly, nebo asociáty se surfaktanty, jak je uvedeno v přehledu [12].

V této studii byly použity celkem tři značené nukleosidy: benzofurazanem značený 2'-deoxycytidin (dC^{BF}), 4-nitrofenyltriazolem značený 7-deazaadenosin (dA^{TRNO2}) a 4-nitrofenyltriazolem značený 2'-deoxycytidin (dC^{TRNO2}).

3.2.1 Elektrochemická studie 2'-deoxycytidinu značeného benzofurazanem

Elektrochemická studie 2'-deoxycytidinu značeného benzofurazanem (dC^{BF}) (obr. 2A) byla provedena pomocí cyklické voltametrie. Pro kontrolu byla použita elektroda z pyrolytického grafitu. Je známo, že benzofurazan se přenosem 6ti elektronů redukuje na diaminobenzen a ve zpětném anodickém skenu je tedy možné pozorovat oxidaci těchto aminoskupin [62, 68]. Na BDD elektrodě není redukce benofurazanu příliš zřetelná, jak je vidět na cyklických voltamogramech v obr. 8. Z voltamogramů

naměřených na PGE je vidět jak redukce benzofurazanu u potenciálu $-0,8$ V, tak následná oxidace aminoskupin u $+0,4$ V. Elektrochemická odezva benzofurazanu jako značky byla sledována i na jiných typech elektrod, jak je ukázáno ve studiích na PGE a HMDE [62]. Z přiložených cyklických voltamogramů je zřejmé, že BDD elektroda není vhodná pro detekci tohoto typu značení DNA nukleosidů. Studie takto značeného nukleosidu na BDD elektrodě nadále nepokračovala.



Obr. 8: Cyklické voltamogramy dC^{BF} ($c = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, plné čáry) měřené na PGE (černé křivky), na leštěné BDD elektrodě (červené křivky), změřené pozadí ve $0,2\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ octanovém pufru o pH 5,0 (čerchované křivky). Šipka vyznačuje směr skenu. Rychlost skenu $500 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

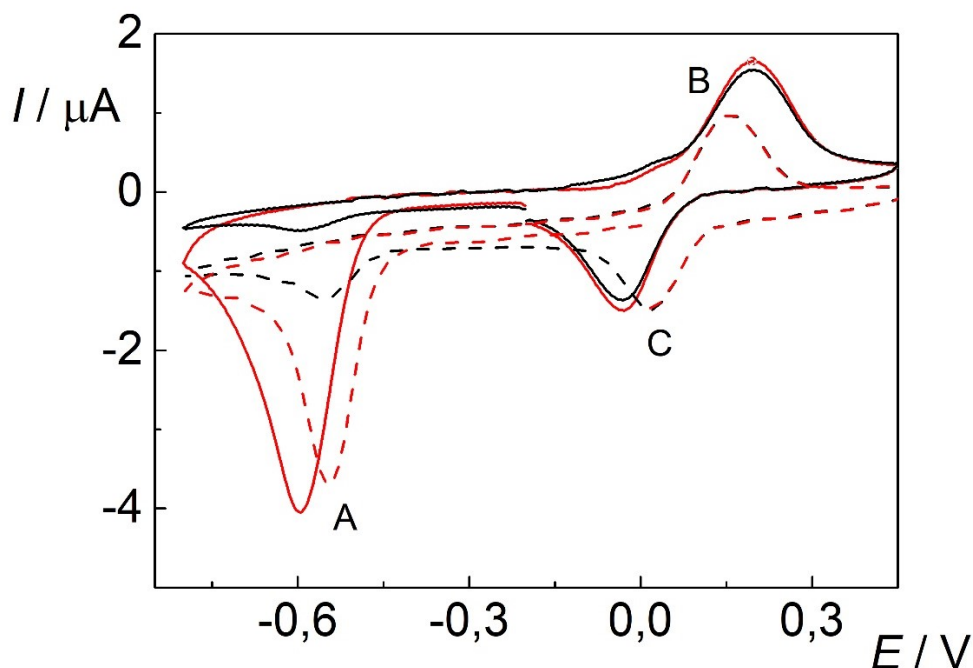
3.2.2 Elektrochemická studie 2'-deoxycytidin a 7-deazaadenosinu značeného 4-nitrofenyltriazolem

3.2.2.1 Cyklická voltametrie dC^{TRNO_2} a dA^{TRNO_2}

Oba nukleosidy 7-deazaadenosin a 2'-deoxycytidin značené 4-nitrofenyltriazolem mají ve své struktuře obr. 2, kapitola 1.2.2 snadno redukovatelnou NO_2 skupinu. NO_2 skupina je dobře redukovatelná na mnoha typech elektrod s dostatečně širokým potenciálovým oknem v katodické oblasti. Cyklická voltametrie a SW voltametrie byly použity pro studii elektrochemického chování takto značených nukleosidů. Nejprve byla provedena studie měření *in-situ*, tedy přímo v roztoku značeného nukleosidu. Na obr. 9 jsou uvedeny cyklické voltamogramy dC^{TRNO_2} a dA^{TRNO_2} se snadno redukovatelnou značkou obsahující NO_2 skupinou. Ze záznamu na obr. 9 je vidět ireverzibilní redukce NO_2 skupiny na hydroxylamin při potenciálu -585 mV (pík A obr. 9) dle rovnice 4 (kapitola 1.2.2). Tento potenciál redukce NO_2 skupiny je srovnatelný s výsledky na jiných typech elektrod [62, 71]. Dále jsou zřejmé píky redoxního páru $NHOH/NO$ (obr. 9 píky B a C), kdy je zřejmá oxidace hydroxylaminu na nitroso skupinu u $+180$ mV a následná zpětná redukce NO skupiny na hydroxylamin u -20 mV, které jsou typické pro elektrochemii NO_2 skupiny (rovnice 5, kapitola 1.2.2). Oba studované analyty pasivují elektrodu již po prvním cyklu, jak je zřejmé z velkého poklesu hlavního redukčního píku na voltamogramech obr. 9, o cca 95 % mezi prvním a druhým následným skenem pro dA^{TRNO_2} i dC^{TRNO_2} . Po pasivaci elektrody dochází pouze ke stabilní reverzibilní redukci/oxidaci hydroxylaminu na nitroso skupinu a zpět (obr. 9, píky B a C). Dochází tedy k silné adsorpci produktu redukce značeného nukleosidu na elektrodový povrch. Pro obnovení povrchu BDD filmu je nutné zařadit mechanické čištění pomocí Al_2O_3 na jemné látce jako leštící podložce. Jako optimální aktivace elektrodového povrchu bylo zvoleno 30ti sekundové leštění elektrody. Po této aktivaci je signál redukce nitroskupiny opět reprodukovatelný.

Cyklická voltametrie byla dále použita pro studii závislosti rychlosti polarizace elektrody na voltametrické odezvě analytu. Jako analyt byl použit dA^{TRNO_2} , jelikož nebyl pozorován významný rozdíl voltametrických signálů mezi oběma zkoumanými značenými nukleosidy. Pro studii bylo použito několik rychlostí polarizace elektrody, a to od $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ do $1000 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Z naměřených dat bylo zjištěno, že redukce nitro skupiny značeného nukleosidu dA^{TRNO_2} je pravděpodobně řízena adsorpcí, což bylo

potvrzeno i lineární závislostí výšky píku na odmocnině z rychlosti polarizace elektrody pro všechny pozorovatelné píky.



Obr. 9: První (červený) a druhý (černý) sken cyklické voltametrie ($0,5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$) $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ (plná čára), $\text{dC}^{\text{TRNO}_2}$ (čerchovaná) (oba $c = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ octanovém pufru o pH 5,0, měřeno na leštěné BDD elektrodě. (Převzato z publikace 2)

3.2.2.2 Transferové adsorpční metody $\text{dC}^{\text{TRNO}_2}$ a $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$

Pro studii možnosti využití transferových metod na BDD elektrodě pro detekci $\text{dC}^{\text{TRNO}_2}$ a $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ byla použita SW voltametrie s optimalizovanými parametry a CV [2]. Pro optimalizaci SW voltametrie bylo sledováno několik nastavitelných parametrů metody jako frekvence, amplituda a potenciálový krok. SW voltametrie byla optimalizována při měření $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ v prostředí $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ octanového pufru o pH 5,0. Jako optimální parametry byly zvoleny: frekvence 100 Hz, amplituda 150 mV a potenciálový krok 5 mV.

Oba studované analyty vykazovaly schopnost samovolné adsorpce na povrch BDD elektrody. BDD elektroda byla ponořena do roztoku analytu ($c = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) po definovaný čas akumulace s otevřeným obvodem. Elektroda byla poté vyjmuta z roztoku opláchnuta deionizovanou vodou pro odstranění zbytků akumulárního roztoku z elektrody a jemně osušena. S takto připravenou elektrodou byly v čistém základním elektrolytu změřeny voltamogramy (obr. 10). Obě použité voltametrické

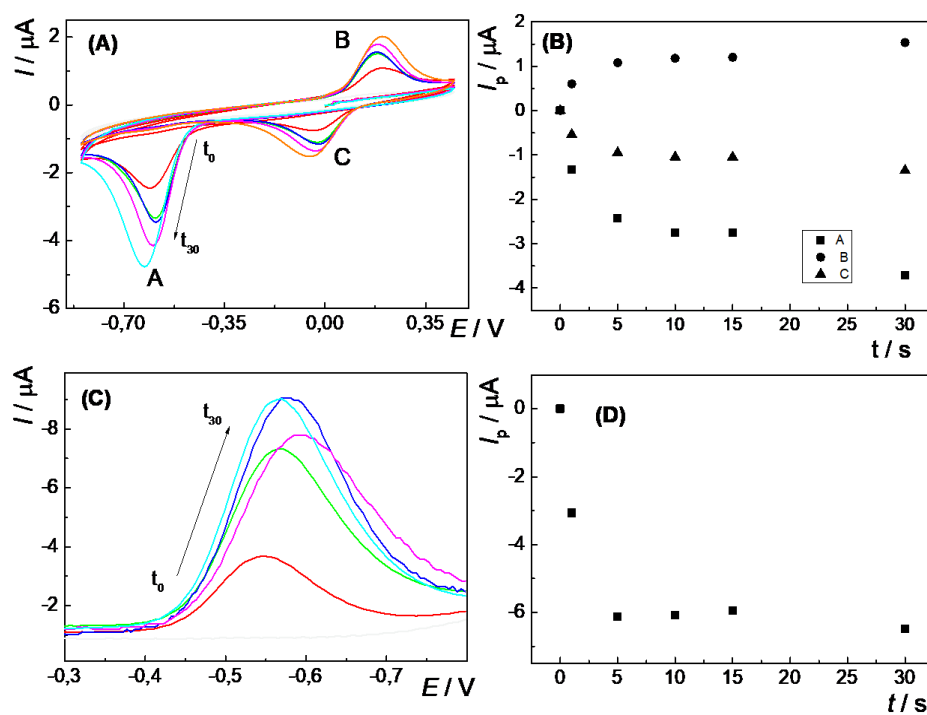
metody vykazují nárůst I_p s rostoucím časem akumulace značených nukleosidů na povrch elektrody. Nejvýraznější nárůst I_p byl po 5s akumulaci. Další mírné zvýšení I_p bylo zaznamenáno po akumulaci až do 30 s. U cyklických voltamogramů (obr. 10) je také zřejmý nárůst proudu při odezvě pro redoxní pár NHOH/NO (viz také vyhodnocení výšek píků obr 10 B).

Adsorpce značených nukleosidů byla také sledována pomocí kompetitivní adsorpce 7-deazaadenosinu značeném fenylnitroskupinou (dA^{TR}) a 7-deazaadenosinu značeným 4-nitrofenylnitroskupinou (dA^{TRNO2}). Nukleosid dA^{TR} vzhledem k absenci NO₂ skupiny není elektrochemicky aktivní látka, což bylo ověřeno pomocí transferové cyklické voltametrie i cyklické voltametrie v roztoku dA^{TR} ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (viz obr. 11, modré křivky). Elektroda byla ponořena do roztoku dA^{TRNO2} ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), po dobu 15 s. Následně byla elektroda ponořena do roztoku základního elektrolytu obsahující dA^{TR} ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), ve kterém probíhalo měření cyklickou voltametří. První sken naměřený BDD elektrodou, na které je naadsorbován dA^{TRNO2} s dA^{TR} v základním elektrolytu vykazuje nižší signály dA^{TRNO2} oproti dřívějším záznamům (viz. obr. 10). V následných skenech dochází ke snížení výšky píků z důvodu desorpce produktů dA^{TRNO2} nebo výměny produktů za dA^{TR}. Dále bylo zaznamenáno, že dochází k posunu potenciálů všech tří píků ve směru skenu. Což indikuje, že přítomnost dA^{TR} v základním elektrolytu, který stěžuje redoxní reakci. Tento efekt ovšem nebyl pozorován v opačném uspořádání, kdy byl na elektrodu po dobu 15s adsorbován dA^{TR} a posléze byla elektroda měřena v roztoku základního elektrolytu s dA^{TRNO2}. Při výměně dA^{TR} za dA^{TRNO2} dochází ke změně naadsorbované vrstvy a tím ke změně dostupnosti redoxního centra dA^{TRNO2} čímž dochází ke zpomalení kinetiky přenosu elektronu. Z naměřených dat je možné vyvodit, že jak dA^{TR} tak dA^{TRNO2} se silně adsorbují na povrch BDD elektrody, což není pro tento elektrodový materiál typické.

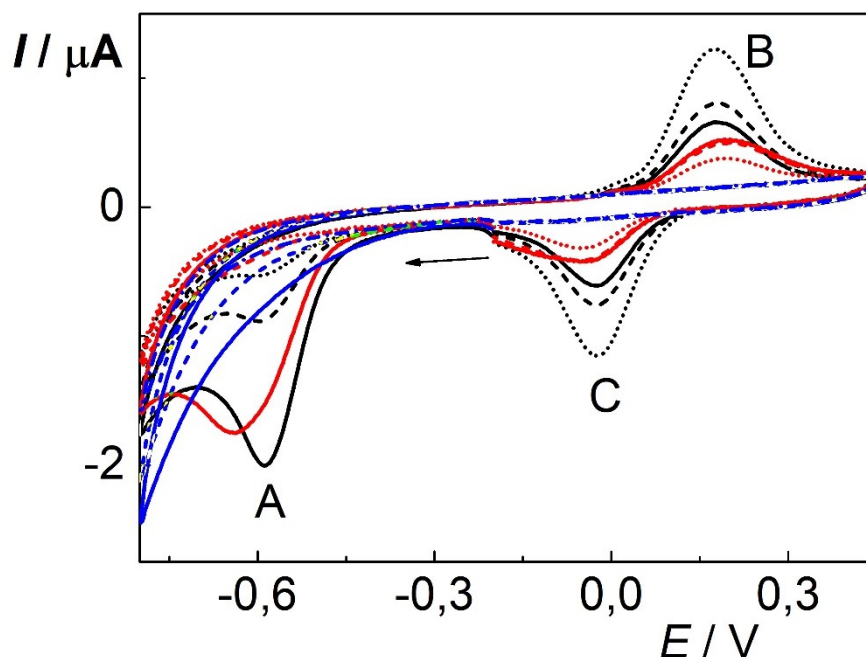
Dalším bodem studie byly použity dvě jednoduché aromatické nitrosloučeniny 2-nitronaftalen a 4-nitrofenylacetylen, které nevykazují samovolnou adsorpci na povrch BDD elektrody. Pro zachování matričního efektu byly látky připraveny rozpuštěním v dimethylsulfoxidu a výsledný měřený roztok byl zachován v běžném poměru. Za běžného měření ve vsádkové analýze cyklickou voltametří obě látky vykazují dobře vyvinutý pík redukce nitroskupiny, ovšem píky redoxního páru NHOH/NO jsou méně vyvinuty, při zvyšujícím se počtu skenů nedochází k tak velkému zvýšení signálu oproti měření dA^{TRNO2}. Při měření dochází k menšímu poklesu signálu redukce nitroskupiny

se zvyšujícím se počtem skenů oproti získaným výsledkům z měření roztoku $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$. Z naměřených dat plyne, že redukční produkty obou sledovaných látek 2-nitronaftalenu a 4-nitrofenylacetyleny vykazují méně silnou adsorpci na povrch BDD elektrody než $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$. Dále byla provedena studie pomocí cyklické voltametrie 2-nitronaftalenu a 4-nitrofenylacetyleny na BDD elektrodě pokryté naadsorbovaným dA^{TR} ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) po dobu 2 s, 15 s a 30 s. Již po 2s akumulaci dA^{TR} byl pozorován posun redoxních potenciálů signálů obou analytů ve směru skenu. Zatímco redukce nitroskupiny zůstává dobře viditelná i při adsorpci dA^{TR} , tak signál redoxního páru 4-nitrofenylacetyleny není prakticky viditelný, signál redoxního páru 2-nitronaftalenu byl potlačen. Povrch elektrody byl téměř celý pokryt dA^{TR} již po 2s akumulaci.

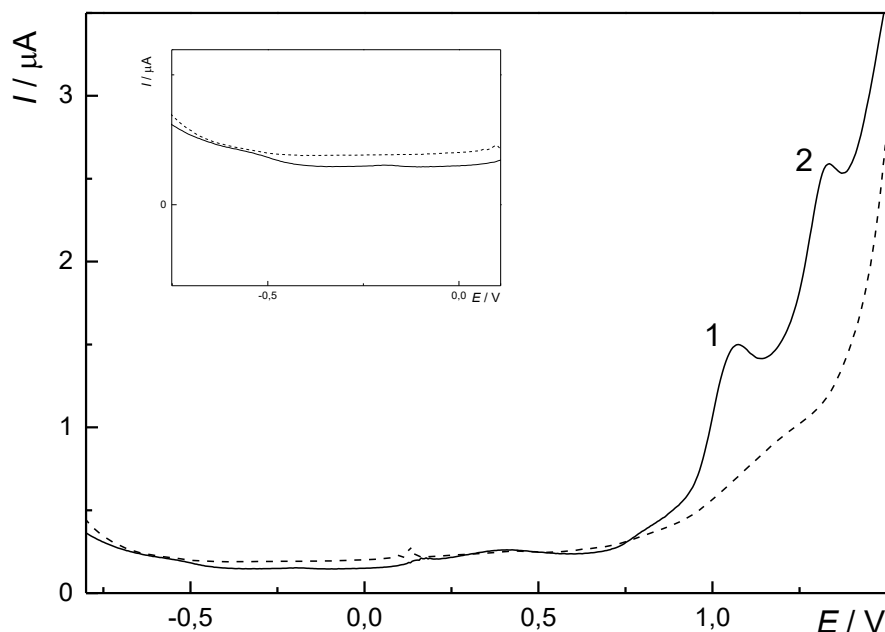
Poslední část studie byla provedena se značenou DNA, která obsahovala značený cytidin snadno redukujícím se 4-nitrofenyltriazolem. Značená DNA byla připravena pomocí prodlužování primerů, jak je popsáno [72]. Analýza byla provedena pomocí SW a CV transferových voltametrických metod, kdy byla akumulace DNA ($c = 20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) provedena po dobu 60 s a po transferu bylo měření provedeno v octanovém pufru o pH 5,0. Redukce NO_2 skupiny nebyla při analýze zřetelná, jak je vidět na SW voltamogramech v obrázku 12 a ve vloženém grafu (SW voltamogramy z oblasti redukce nitroskupiny). Akumulace DNA byla i přes neviditelnou redukci NO_2 skupiny úspěšná, jak je vidět z oxidační odezvy elektrody pro guanin (1) a adenin (2), které byly při stejných potenciálech pozorované i v jiných studiích jak na BDD elektrodě [60] tak na uhlíkových elektrodách, jak je uvedeno v úvodu. Oxidace bází guaninu a adeninu byla zaznamenána na GCE, kdy se poloha oxidačního potenciálu mírně odlišuje [58], nebo na PGE [56].



Obr. 10: Adsorpční transferové cyklické (A) (rychlost polarizace $0,5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$) a SW (C) voltamogramy $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ ($c = 10 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) pro různé časy akumulace (t): 0s, 1s, 5s, 10s, 15s, 30s, přenášeno do čistého základního elektrolytu – $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ octanového pufru o pH 5,0. A závislosti výšek píků na čase akumulace $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ na leštěnou BDD elektrodu.



Obr. 1: Cyklické voltamogramy kompetitivní adsorpce dA^{TR} a $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ na BDD povrchu. Modré křivky – voltamogramy roztoku dA^{TR} ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v základním elektrolytu; červené křivky – voltamogramy z transferové CV $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ (doba akumulace 15 s, $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), měřeno v základním elektrolytu obsahujícím dA^{TR} , $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, černé křivky - voltamogramy z transferové CV dA^{TR} (doba akumulace 15 s, $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) měřeno v základním elektrolytu obsahujícím $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$, $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Základní elektrolyt ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ octanový pufr o pH 5,0), rychlost polarizace elektrody $0,5 \text{ V} \cdot \text{s}^{-1}$, první sken (plná křivka), druhý sken (čerchovaná křivka) a desátý sken (tečkovaná křivka). (Převzato z Publikace 2)

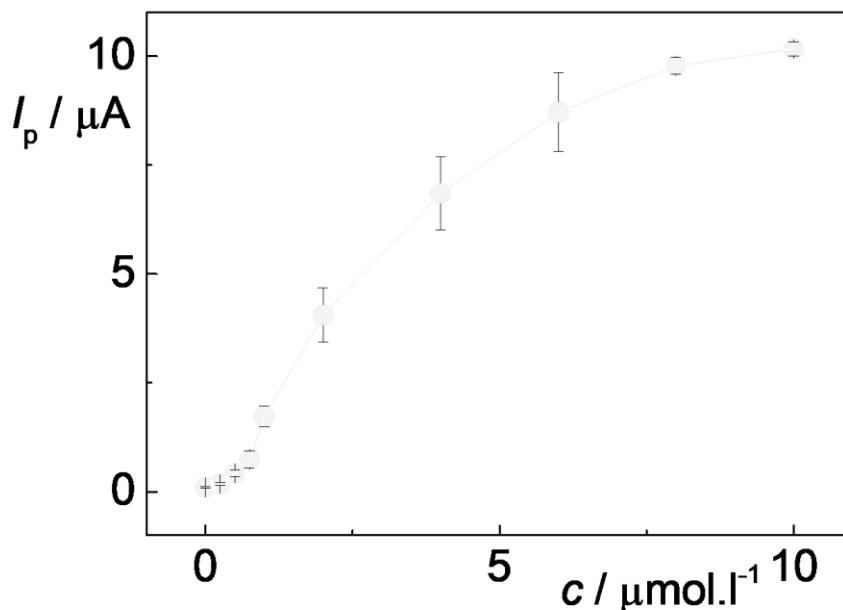


Obr. 12: SW voltamogramy DNA ($c = 20 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, plná křivka) obsahující $\text{dC}^{\text{TRNO}_2}$ měřené v $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ octanovém pufru o pH 5,0 (čerkovaná křivka), měřeno pomocí adsorbční transferové metody při akumulaci po dobu 60 s. Pík (1) guanin, pík (2) adenosin.

3.2.3 Kalibrační závislost

Ze získaných poznatků byl sestaven postup pro měření kalibrační závislosti, především pro zjištění limitu detekce BDD elektrody pro stanovení značených nukleosidů. Pro určení kalibrační závislosti bylo použito jak klasického měření přímo v roztoku, tak adsorbčních transferových metod. Byla použita jak cyklická, tak SW voltametrie. Z důvodu malého množství analyzovaných nukleosidů byla kalibrační závislost určována pouze pro $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$. Pro stanovení $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ lze využít jak katodického signálu redukce NO_2 skupiny, tak odezvu redoxního páru NHOH/NO . V případě transferových metod byl použit následující postup pro obě voltametrické metody. Značený nukleosid byl akumulován na BDD elektrodu po dobu 15 s, elektroda byla poté přenesena do 4 ml octanového pufru o pH 5,0. Byla měřena koncentrační závislost v rozsahu $0,25$ až $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro transferovou adsorbční SW voltametrii a odezvu redoxního páru NHOH/NO je kalibrační závislost znázorněna na obr. 12. Koncentrační závislost

má esovitý charakter, což naznačuje adsorpci $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ na povrch elektrody. Při vyšších koncentracích $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ v roztoku dochází kvůli adsorpci $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ k saturaci elektrodového povrchu, nedochází tak ke zvýšení sledovaného signálu $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$. Koncentrační závislost tvarem odpovídá adsorpční izotermě. Stejného tvaru kalibrační závislosti bylo dosaženo i pro obdobné analyty analyzované pomocí HMDE [71].



Obr. 13: Kalibrační závislost redoxního páru NHOH/NO redukovaného $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ vypočítaná z transferové adsorpční SW voltametrie. Pro 15s akumulaci $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$, analyzované v čistém základním elektrolytu ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$ acetátový pufr o pH 5,0) s rozsahem skenu $-0,8 \text{ V}$ do $+0,45 \text{ V}$. Parametry měření: frekvence 100 Hz , amplituda 150 mV , krok 5 mV . Chybové usečky znázorňují RSD pro $n=4$. (Převzato z publikace 2)

3.2.4 Závěr

Nukleosid 2'-deoxycytidin značený benzofurazanem, 2'-deoxycytidin značený 4-nitrofenyltriazolem a 7-deazaadenosin značený 4-nitrofenyltriazolem byly studované pomocí voltametrických technik na leštěné BDD elektrodě (kapitola 2.1, obr. 3A) v prostředí octanového pufru o pH 5,0.

Pro dC^{BF} byl získán pouze nevýrazný katodický signál. Pro $\text{dC}^{\text{TRNO}_2}$ a $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$ byla pozorována silná adsorpce na povrch BDD elektrody. Při následných skenech pomocí

cyklické voltametrie se snižuje pík redukce NO_2 skupiny a objevují se signály quasi-reversibilního páru NHOH/NO , které se s narůstajícím počtem cyklů nemění. Sledování vysoce stabilního quasi-reverzibilní páru ($\Delta E_p = 0,2 \text{ V}$) může být použito pro kvantifikaci nukleosidů značených touto snadno redukovatelnou skupinou pomocí transferových metod a SW voltametrie. Tento přístup je inovativní, prozatím bylo publikováno využití transferových technik s BDD elektrodou pro fenolické látky a karboxylové kyseliny v neiontové formě [69, 73]. Dále byla studie věnována právě adsorpci analytů na povrch BDD elektrody, kdy byl brán zřetel na důležitost struktury molekuly. Adsorpce byla pozorována i pro 7-deazaadenin značený fenylnitrazolem bez přítomnosti nitro skupiny. Redukce dalších nitrosloučenin (4-nitrofenylacetylen, 2-nitronaftalen), které nevykazují silnou adsorpci na povrch BDD elektrody jsou v přítomnosti dA^{TR} blokovány díky obsazenému povrchu elektrody.

3.3 Shrnutí

V této práci byly testovány BDD elektrody s různou úpravou povrchu pro vybrané oxidovatelné a redukovatelné látky, konkrétně *p*- a *o*- izomery kresolu, 2'-deoxycytidin a 7-deazaadenosin značených 4-nitrofenyltriazolem ($\text{dC}^{\text{TRNO}_2}$ a $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$), 2'-deoxycytidin značený benzofurazanem. Cílem práce byl vývoj voltametrických metod detekce studovaných látek, popřípadě použití BDD jako pracovní elektrody v průtokových systémech a studium elektrochemických a adsorpčních dějů.

Kresoly jako modelové fenolické polutanty se oxidují na BDD elektrodách obdobně jako na ostatních uhlíkových površích. *In-situ* anodická aktivace umožňuje rychlou regeneraci povrchu BDD elektrody před každým skenem. Vyvinutá voltametrická metoda, která byla testována na modelových vzorcích říční vody, tak představuje rychlou a levnou metodu pro detekci kresolů, pokud nejsou přítomny ve směsi. Pro analýzu směsi kresolů a dalších fenolických polutantů je potřeba provést jejich separaci. Navržená HPLC-ED metoda ukazuje, že BDD elektrody jsou vhodným elektrodovým materiálem při průtokových analýzách i pro analyty (jako jsou fenolické látky) výrazně pasivující povrch elektrody při vsádkových měřeních, jelikož je elektroda čištěna díky průtoku mobilní fáze od pasivujících meziproduktů a produktů [1].

BDD elektrody jsou stále více vyhledávaným typem elektrodového materiálu i pro redukční děje, jak bylo ukázáno na příkladě redukce 4-nitrofenyltriazolem značených 2'-deoxycytidinu a 7-deazaadenosinu. Tyto komplexní molekuly se adsorbují na povrch elektrody, čímž přispívají k prvotnímu tvrzení o odolnosti BDD elektrod vůči adsorpci [10]. BDD lze tedy využít k transferovým technikám, jak bylo ukázáno na příkladě SW voltametrické detekci $\text{dA}^{\text{TRNO}_2}$. Adsorbovaný produkt redukce, hydroxylamin podléhá následné oxidaci na nitrosokupinu a quasi-reversibilní pár lze pak použít ke kvantifikaci samotného nukleosidu.

Jednou z pozitivních vlastností borem dopovaných elektrod je jejich nízká náchylnost k pasivaci elektrodového povrchu, oproti jiným běžně užívaným elektrodám. Díky nízké náchylnosti k pasivaci a snadné obnově povrchu elektrody jsou vhodným materiálem pro elektrochemickou detekci v průtokových metodách. Pro některé studované analyty byla zjištěna jejich silná adsorpce na povrch elektrody, která umožňuje použití transferových metod pro tento typ látek. Závěrem studie je možné říci, že borem dopované diamantové elektrody jsou vhodným elektrodovým materiálem pro selektivní detekci organických látek.

4 Literatura

- [1] J. Vosahlova, J. Sochr, S. Baluchová, L. Švorc, A. Taylor, and K. Schwarzova-Peckova, "Comparison of Carbon-based Electrodes for Detection of Cresols in Voltammetry and HPLC with Electrochemical Detection," *Electroanalysis*, vol. 32, 2020.
- [2] J. Vosáhlová, L. Koláčná, A. Daňhel, J. Fisher, J. Balintová, M. Hocek, K. Schwarzová-Pecková, M. Fojta, "Voltammetric and adsorption study of 4-nitrophenyl-triazole-labeled 2'-deoxycytidine and 7-deazaadenosine nucleosides at boron-doped diamond electrode," *J. Electroanal. Chem.*, vol 821, 2018 p 111-120.
- [3] J. Vosahlova, "Vliv koncentrace boru na elektrochemické vlastnosti borem dopovaných diamantových elektrod v elektroanalýze," *Univerzita Karlova*, 2013.
- [4] J. Vosáhlová, "Borem dopované diamantové elektrody: Využití pro stanovení redukovatelných organických látek," *Univerzita Karlova*, 2015.
- [5] K. Schwarzová-Pecková, J. Vosáhlová, J. Barek, I. Šloufová, E. Pavlová, V. Petrák, J. Zavázalová, "Influence of boron content on the morphological, spectral, and electroanalytical characteristics of anodically oxidized boron-doped diamond electrodes," *Electrochim. Acta*, vol. 243, 2017, p 170-182
- [6] J. Vosáhlová, J. Zavázalová, and K. Schwarzova-Peckova, "BOREM DOPOVANÉ DIAMANTOVÉ ELEKTRODY : VLIV KONCENTRACE BORU NA STANOVENÍ 2-AMINOBIFENYLU" vol. 108, *Cena Merck* 2014, pp. 270–273, 2014.
- [7] J. Vosáhlová, J. Zavázalová, V. Petrák, and K. Schwarzová-Pecková, "Factors influencing voltammetric reduction of 5-nitroquinoline at boron-doped diamond electrodes," *Monatshefte fur Chemie*, vol. 147, no. 1, pp. 21–29, 2016.
- [8] S. Lips and S. R. Waldvogel, "Use of Boron-Doped Diamond Electrodes in Electro-Organic Synthesis," *elektrochem*, vol. 6, pp. 1649–1660, 2019.
- [9] Y. He, H. Lin, Z. Guo, W. Zhang, H. Li, and W. Huang, "Recent developments and advances in boron-doped diamond electrodes for electrochemical oxidation of organic pollutants," *Sep. Purif. Technol.*, vol. 212, pp. 802–821, 2019.
- [10] K. Pecková, J. Musilová, and J. Barek, "Boron-doped diamond film electrodes-new tool for voltammetric determination of organic substances," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 39, no. 3, pp. 148–172, 2009.
- [11] N. Yang, S. Yu, J. V Macpherson, and Y. Einaga, "Conductive diamond: synthesis, properties, and electrochemical applications," *Chem. Soc. Rev.*, pp. 157–204, 2019.
- [12] S. Baluchová, A. Daňhel, H. Dejmková, V. Ostatná, M. Fojta, and K. Schwarzová-pecková, "Recent progress in the applications of boron doped diamond electrodes in electroanalysis of organic compounds and biomolecules," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1077, pp. 30–66, 2019.
- [13] K. Muzyka, J. Sun, and H. Fereja, "Boron-doped diamond : current progress and challenges in view of electroanalytical applications," *Analytical Methods*, vol 11, pp. 397–414, 2019.
- [14] J. M. Freitas, C. Oliveira, R. Alejandro, A. Munoz, and E. M. Richter, "Boron Doped Diamond Electrodes in Flow-Based Systems," *Frontiers in chemistry*, vol. 7,n. 190, 2019.

- [15] I. B. Dimov, C. Batchelor-mcauley, L. Aldous, and R. G. Compton, "The adsorption of quinizarin on boron-doped diamond," pp. 2375–2380, 2012.
- [16] Z. V. Živcová, O. Frank, V. Petrák, H. Tarábková, J. Vacík, M. Nesládek, L. Kavan, "Electrochemistry and in situ Raman spectroelectrochemistry of low and high quality boron doped diamond layers in aqueous electrolyte solution," *Electrochim. Acta*, vol. 87, pp. 518–525, 2013.
- [17] T. Watanabe, S. Yoshioka, T. Yamamoto, H. Sapehri-Amin, T. Ohkubo, S. Matsumura, Y. Einaga, "The local structure in heavily boron-doped diamond and the effect this has on its electrochemical properties," *Carbon*, vol. 137, pp. 333–342, 2018.
- [18] J. Xu, K. Natsui, S. Naoi, K. Nakata, and Y. Einaga, "Effect of doping level on the electrochemical reduction of CO₂ on boron-doped diamond electrodes," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 86, no. April, pp. 167–172, 2018.
- [19] C. Lévy-Clément, "Semiconducting and metallic boron doped diamond electrodes," in *Diamond electrochemistry*, Akira Fujishima Yasuaki Einaga Tate Narasinga Rao Donald A. Tryk, 2005, p. 586.
- [20] G. R. Salazar-Banda, L. S. Andrade, P. A. P. Nascente, P. S. Pizani, R. C. Rocha-Filho, and L. A. Avaca, "On the changing electrochemical behaviour of boron-doped diamond surfaces with time after cathodic pre-treatments," *Electrochim. Acta*, vol. 51, no. 22, pp. 4612–4619, 2006.
- [21] M. Schwander and K. Partes, "A review of diamond synthesis by CVD processes," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 20, no. 9, pp. 1287–1301, 2011.
- [22] S. N. Demlow, R. Rechenberg, and T. Grotjohn, "The effect of substrate temperature and growth rate on the doping efficiency of single crystal boron doped diamond," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 49, pp. 19–24, 2014.
- [23] K. Peckova and J. Barek, "Boron Doped Diamond Microelectrodes and Microelectrode Arrays in Organic Electrochemistry," *Curr. Org. Chem.*, vol. 15, no. 17, pp. 3014–3028, 2011.
- [24] H. B. Suffredini, V. A. Pedrosa, L. Codognoto, S. A. S. Machado, R. C. Rocha-Filho, and L. A. Avaca, "Enhanced electrochemical response of boron-doped diamond electrodes brought on by a cathodic surface pre-treatment," *Electrochim. Acta*, vol. 49, no. 22–23 SPEC. ISS., pp. 4021–4026, 2004.
- [25] N. Simon et al., "Effect of H and O termination on the charge transfer of moderately boron doped diamond electrodes," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 14, no. 3–7, pp. 1179–1182, 2005.
- [26] R. F. Brocenschi, P. Hammer, C. Deslouis, and R. C. Rocha-Filho, "Assessments of the Effect of Increasingly Severe Cathodic Pretreatments on the Electrochemical Activity of Polycrystalline Boron-Doped Diamond Electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 10, pp. 5363–5368, 2016.
- [27] F. Marken, C. A. Paddon, and D. Asogan, "Direct cytochrome c electrochemistry at boron-doped diamond electrodes," *Electrochem. commun.*, vol. 4, no. 1, pp. 62–66, 2002.
- [28] H. Kato et al., "Heavily phosphorus-doped nano-crystalline diamond electrode for thermionic emission application," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 63, pp. 165–168, 2016.
- [29] P. Kulkarni, L. M. Porter, F. A. . Koecek, Y. J. Tang, and R. J. Nemanich, "Electrical and photoelectrical characterization of undoped and S-doped nanocrystalline diamond films," *J. Appl. Phys.*, vol. 103, no. 8, 2008.

- [30] X. Z. Liao, R. J. Zhang, C. S. L, S. T, and Y. W. L, "The influence of boron doping on the structure and characteristics of diamond thin films," *Diam. Relat. Mater.*, vol. 6, pp. 521–525, 1997.
- [31] J. Zavazalova, K. Prochazkova, and K. Schwarzova-Peckova, "Boron-doped Diamond Electrodes for Voltammetric Determination of Benzophenone-3," *Anal. Lett.*, vol. 49, no. 1, pp. 80–91, 2016.
- [32] M. S. Da Silva Julião, É. C. Almeida, M. A. La Scalea, N. G. Ferreira, R. G. Compton, and S. H. P. Serrano, "Voltammetric behavior of nitrofurazone at highly boron doped diamond electrode," *Electroanalysis*, vol. 17, no. 3, pp. 269–274, 2005.
- [33] K. Peckova and J. Musilova, "Determination of Nitrophenols in Drinking and River Water by Differential Pulse Voltammetry at Boron-Doped Diamond Film Electrode," *Electroanalysis*, vol. 23, no. 5, pp. 1236–1244, 2011.
- [34] J. Karaová, J. Barek, and K. Schwarzová-pecková, "Oxidative and Reductive Detection Modes for Determination of Nitrophenols by High-performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection at a Boron Doped Diamond Electrode," *Anal. Lett.*, vol. 49, no. 1, pp. 66–79, 2016.
- [35] J. Vosahlova, J. Barek, and K. Schwarzova-Peckova, "Determination of Tartrazine and Allura Red at boron doped diamond electrodes," in *36th International Conference on Modern Electrochemical Methods*, 2016, pp. 285–288.
- [36] P. B. Deroco, R. A. Medeiros, R. C. Rocha-filho, and O. Fatibello-filho, "Selective and simultaneous determination of indigo carmine and allura red in candy samples at the nano-concentration range by flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection," *Food Chem.*, vol. 247, no. November 2017, pp. 66–72, 2018.
- [37] R. A. Medeiros, B. C. Lourencao, R. C. Rocha-Filho, and O. Fatibello-Filho, "Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode," *Talanta*, vol. 97, pp. 291–297, 2012.
- [38] J. Cvačka, G. M. Swain, and J. Barek, "Stanovení aminonaftalenů a aminobifenyľů kapalinovou chromatografií s amperometrickou detekcí na diamantové filmové elektrodě," *Chem. List.*, vol. 96, pp. 33–38, 2002.
- [39] H. Dejmkova, M. Scampicchio, J. Zima, and J. Barek, "Determination of Total Phenols in Foods by Boron Doped Diamond Electrode," *Electroanalysis*, vol. 21, no. 9, pp. 1014–1018, 2009.
- [40] "Agency for Toxic Substances and Disease Registry," 2011. [Online]. Available: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=27>.
- [41] I. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, and W. Ruck, "Liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea," vol. 1090, pp. 98–106, 2005.
- [42] M. Brycht, P. Lochyński, J. Barek, S. Skrzypek, K. Kuczewski, and K. Schwarzova-Peckova, "Electrochemical study of 4-chloro-3-methylphenol on anodically pretreated boron-doped diamond electrode in the absence and presence of a cationic surfactant," *J. Electroanal. Chem.*, vol. 771, pp. 1–9, 2016.
- [43] "Agency for Toxic Substances and Disease Registry," cresols. [Online]. Available: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=196>.

- [44] “European Chemicals Agency.” [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.003.090>.
- [45] “European Chemicals Agency.” [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/cs/substance-information/-/substanceinfo/100.002.204>.
- [46] J. Vohlídal, A. Julák, and K. Štulík, *chemické a analytické tabulky*. 1999.
- [47] V. Kavitha and K. Palanivelu, “Destruction of cresols by Fenton oxidation process,” *Water Res.*, vol. 39, no. 13, pp. 3062–3072, 2005.
- [48] C.-W. Lee et al., “Rapid HPLC Method for the Simultaneous Determination of Eight Urinary Metabolites of Toluene, Xylene and Styrene,” *Bull. Korean Chem. Soc.*, vol. 30, no. 9, pp. 2021–2026, 2009.
- [49] S. Fustinoni, R. Mercadante, L. Campo, L. Scibetta, C. Valla, and V. Fo, “Determination of urinary ortho - and meta -cresol in humans by headspace SPME gas chromatography / mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 817, pp. 309–317, 2005.
- [50] E. S. Ms et al., “Phenolic Compounds in Particles of Mainstream Waterpipe Smoke,” *Nicotine Tob. Res.*, vol. 15, no. 6, pp. 1107–1112, 2020.
- [51] S. Saha, R. Mistri, and B. C. Ray, “RESEARCH PAPER A rapid and selective method for simultaneous determination of six toxic phenolic compounds in mainstream cigarette smoke using single-drop microextraction followed by liquid chromatography – tandem mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 28, pp. 9265–9272, 2013.
- [52] T. Schettgen, A. Alt, P. Dewes, and T. Kraus, “Simple and sensitive GC/MS-method for the quantification of urinary phenol, o- and m-cresol and ethylphenols as biomarkers of exposure to industrial solvents,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 995–996, pp. 93–100, 2015.
- [53] D. Rajkumar and K. Palanivelu, “KINETICS , CATALYSIS , AND REACTION ENGINEERING Electrochemical Degradation of Cresols for Wastewater Treatment,” *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 42, no. 9, pp. 1833–1839, 2003.
- [54] N. Grootboom and T. Nyokong, “Electrooxidation of cresols on carbon electrodes modified with phthalocyaninato and octabutoxyphthalocyaninato cobalt (II) complexes,” vol. 432, pp. 49–57, 2001.
- [55] E. Paleček and M. Bartošík, “Electrochemistry of nucleic acids,” *Chem. Rev.*, vol. 112, no. 6, pp. 3427–3481, 2012.
- [56] J. Špaček, A. Daňhel, S. Hasoň, and M. Fojta, “Label-free detection of canonical DNA bases, uracil and 5-methylcytosine in DNA oligonucleotides using linear sweep voltammetry at a pyrolytic graphite electrode,” *Electrochem. commun.*, vol. 82, no. June, pp. 34–38, 2017.
- [57] G. Garbellini, C. Uliana, and H. Yamanaka, “Detection of DNA nucleotides on pretreated boron doped diamond electrodes,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 22, no. 7, pp. 1241–1245, 2011.
- [58] A. M. Oliveira-Brett, J. A. P. Piedade, L. A. Silva, and V. C. Diculescu, “Voltammetric determination of all DNA nucleotides,” *Anal. Biochem.*, vol. 332, no. 2, pp. 321–329, 2004.
- [59] A. Brotons, F. J. Vidal-Iglesias, J. Solla-Gullón, and J. Iniesta, “Carbon materials for the

- electrooxidation of nucleobases, nucleosides and nucleotides toward cytosine methylation detection: A review,” *Anal. Methods*, vol. 8, no. 4, pp. 702–715, 2016.
- [60] T. A. Ivandini, K. Honda, T. N. Rao, A. Fujishima, and Y. Einaga, “Simultaneous detection of purine and pyrimidine at highly boron-doped diamond electrodes by using liquid chromatography,” *Talanta*, vol. 71, no. 2, pp. 648–655, 2007.
- [61] C. Prado, G.-U. Flechsig, P. Gröndler, J. S. Foord, F. Marken, and R. G. Compton, “Electrochemical analysis of nucleic acids at boron-doped diamond electrodes,” *Analyst*, vol. 127, no. 3, pp. 329–332, 2002.
- [62] J. Balintová, M. Plucnara, P. Vidláková, R. Pohl, L. Havran, M. Fojta, M. Hocek “Benzofurazane as a new redox label for electrochemical detection of DNA: Towards multipotential redox coding of DNA bases,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 19, no. 38, pp. 12720–12731, 2013.
- [63] A. Danhel, V. Raindlova, L. Havran, H. Pivonkova, M. Hocek, and M. Fojta, “Electrochemical behaviour of 2,4-dinitrophenylhydrazine as multi-redox centre DNA label at mercury meniscus modified silver solid amalgam electrode,” *Electrochim. Acta*, vol. 126, pp. 122–131, 2014.
- [64] P. Zuman, Z. Fijalek, D. Dumanovic, and D. Suznjevic, “Polarographic and Electrochemical Studies of Some Aromatic and Heterocyclic Nitro-Compounds, .1. General Mechanistic Aspects,” *Electroanalysis*, vol. 4, no. 8, pp. 783–794, 1992.
- [65] E. Laviron, A. Vallat, and R. Meunier-Prest, “The Reduction-Mechanism of Aromatic Nitro-Compounds in Aqueous-Medium .5. the Reduction of Nitrosobenzene between Ph-0.4 and Ph-13,” *J. Electroanal. Chem.*, vol. 379, no. 1–2, pp. 427–435, 1994.
- [66] K. Pecková, J. Barek, T. Navratil, B. Yosypchuk, and J. Zima, “Voltammetric Determination of Nitronaphthalenes at a Silver Solid Amalgam Electrode,” *Anal. Lett.*, vol. 42, no. 15, pp. 2339–2363, 2009.
- [67] J. Balintová, J. Špaček, R. Pohl, M. Brázdová, L. Havran, M. Fojta, M. Hocek, “Azidophenyl as a click-transformable redox label of DNA suitable for electrochemical detection of DNA – protein interactions,” *Chem. Sci.*, vol. 6, pp. 575–587, 2015.
- [68] A. Danhel, V. Raindlova, L. Havran, J. Barek, M. Hocek, and M. Fojta, “Voltammetric Study of dsDNA Modified by Multi-redox Label Based on N-methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan,” *Electrochim. Acta*, vol. 129, pp. 348–357, 2014.
- [69] Y. Yardim, A. Levent, E. Keskin, and Z. Senturk, “Voltammetric behavior of benzo a pyrene at boron-doped diamond electrode: a study of its determination by adsorptive transfer stripping voltammetry based on the enhancement effect of anionic surfactant, sodium dodecylsulfate,” *Talanta*, vol. 85, pp. 441–448, 2011.
- [70] A. Levent, Y. Yardim, and Z. Şentürk, “Electrochemical performance of boron-doped diamond electrode in surfactant-containing media for amroxol determination,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 203, pp. 517–526, 2014.
- [71] P. Vidláková, H. Pivoňkova, M. Fojta, and L. Havran, “Electrochemical behavior of anthraquinone- and nitrophenyl- labeled deoxynucleoside triphosphates : a contribution to development of multipotential redox labeling of DNA,” *Monatshefte für Chemie*, vol. 146, pp. 839–847, 2015.
- [72] M. Hocek, “PŘÍPRAVA DNA S MODIFIKOVANÝMI BÁZEMI ENZYMATICKOU INKORPORACÍ NUKLEOSID-TRIFOSFÁTŮ,” *Chem. List.*, vol. 108, pp. 320–325,

2014.

- [73] Y. Yardım, M. Gülcan, and S. Zühre, “Determination of vanillin in commercial food product by adsorptive stripping voltammetry using a boron-doped diamond electrode,” *Food Chem.*, vol. 141, pp. 1821–1827, 2013.

5 Poděkování

Disertační práce byla vypracována v rámci projektů specifického univerzitního výzkumu (projekty SVV 260560 a 260440) a finančně podporována Univerzitou Karlovou (projekty GAUK č. 1390217) a Grantovou agenturou České republiky (projekty 20-03187S a P206/12G151).

Dále bych chtěla poděkovat především vedoucí práce a konzultantům, za odborné vedení a pomoc při studiu. Svým kolegům, kteří mi umožnili i při práci pokračovat ve studiu. Svým rodičům a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.